DESCRIPTION

VECTORS'WITH MODIFIED PROTEASE-DEPENDENT TROPISM

5 Technical Field

The present invention relates to cell fusion vectors with modified protease-dependent tropism, and methods for producing the same. The vectors of this invention are useful as gene therapy vectors that show cancer-specific infection.

10

15

20

25

35

Background Art

Development of gene therapy for cancer has been advancing in recent years. Hitherto, the present inventors have developed gene therapy vectors using the Sendai virus (SeV). SeV is a virus of the paramyxovirus family and belongs to a group of viruses comprising nonsegmented negative strand RNA as its genome. Paramyxoviral vectors enable high transfection rate and overexpression of foreign genes, and are expected to serve as gene therapy vectors for cancer. To date, a number of cancer therapies using paramyxovirus have been performed. For example, BHK21 cells infected with Mumps virus were observed to show anti-tumor effects in tumor-bearing nude mice (Minato, N. et al., J. Exp. Med. 149, 1117-1133, 1979). Similarly, antitumor effects have been reported in other paramyxoviruses. Recently, the antitumor effects of fusogenic proteins are attracting attention. Galanis et al. reported that cancer cells infected with an adenoviral vector that carries the F and HN proteins of measles virus form syncytia, resulting in antitumor effects in vivo (Galanis, E. et al., Hum. Gene Ther. 12, 811-821, 2001).

Needless to say, cancer that does not metastasize can be treated by surgically removing that portion, and metastatic cancer and malignant cancer are considered synonymous. Infiltrating metastatic cancers are known to overexpress matrix metalloprotease (MMP) and/or plasminogen activators (uPA, tPA) (Cox, G., and O'Byrne, K.J., Anticancer Res. 21, 4207-4219, 2001; Andreasen, P.A. et al., Cell Mol. Life. Sci. 57, 25-40, 2000). This overexpression is believed to occur due to the fact that infiltration and metastasis become

possible only after the surrounding extracellular matrix (ECM), which is an obstacle preventing cell transposition during metastasis and infiltration of cancer cells, is degraded through the expression of enzymes (MMP, uPA, tPA) that degrade the ECM by cancer.

On the other hand, three problems have been raised regarding gene therapies for cancer. Firstly, since the gene transfer efficiency into cancer cells is low and gene transfer to the core of a solid cancer cannot be easily accomplished, genes cannot be transfected to the entire cancer. Accordingly, remaining cancer cells start to proliferate again, which leads to recurrence. Secondly, genes are transfected not only to cancer cells but also to normal cells. Toxic genes injure the normal cells, thereby resulting in increased side-effects. Thirdly, the occurrence of infiltration and metastasis as the cancer becomes malignant is a problem in all kinds of cancer therapy. To date, a vectors that solves these problems has not yet been developed.

Disclosure of the Invention

5

10

15

20

25

35

The present invention provides novel cell fusion vectors with modified protease-dependent tropism which infiltrate into surrounding cells only in the presence of a particular protease; and methods for producing the same.

The paramyxovirus family of viruses, which includes Sendai virus, comprise two proteins in their envelope. The fusion (F) protein achieves membrane fusion between the virus and its host cell which results in release of nucleocapsids into the cytoplasm. The hemagglutinin-neuraminidase (HN) protein has hemagglutinating ability and neuraminidase activity, and plays the role of binding to a host receptor. The F and HN proteins are also called spike proteins, as they are displayed on the surface of the viral envelope. The matrix (M) protein lines the envelope and gives rigidity to the viral particle. The characteristics of the present vectors are such that they allow highly efficient gene transfer to a wide variety of cells and animal tissues, and accomplish high level of expression as compared to existing vectors.

The F protein (F0) does not show cell fusion activity. Its fusion

activity is displayed only upon cleavage by a host-derived protease, which results in degradation into F1 and F2. Therefore, the proliferation of viruses carrying the wild-type F protein is limited to those types of tissues that express a trypsin-like protease which allows for cleavage of this protein, such as respiratory mucosal epithelium. Various studies have been carried out on paramyxoviruses regarding modification of the tropism of infection or fusogenicity due to modifications of F. In the interest of SeV, a variant comprising F that is cleaved only by α -chymotripsin has been shown to lose trypsin sensitivity, which, in turn, changes its tropism specific to the cleavage sequence of F (Tashiro, M. et al., J. Gen. Virol. 73 (Pt 6), 1575-1579, 1992). Furthermore, in Newcastle disease virus and in Measles virus, it has been shown that the syncytium-forming ability changes in a trypsin-dependent manner due to the modification of the cleavage sequence of F (Li, Z. et al., J. Virol. 72, 3789-3795, 1998; Maisner, A. et al., J. Gen. Virol. 81, 441-449, 2000).

10

1,5

20

30

35

By modifying the cleavage sequence of the F protein as described above, vectors may be infected to and proliferated in specific tissues and such which express a certain protease. However, one of the problems with paramyxoviral vectors is the secondary release of viruses from cells, which occurs after the vector is introduced into a target cell. In a cell infected with replicative viruses, a virion is formed and daughter viruses are released. Therefore, viral particles also spread to sites other than the target tissue. Although viral particles comprising wild-type F proteins as described above do not show infectivity in the absence of trypsin-like enzymes, viral particles themselves are released from cells. For in vivo administration, the concern is that a viruses that has spread into the blood will spread to the entire body. Furthermore, release of virus-like particles (VLPs) has been observed from cells transfected with F gene-deficient SeV (Li, H.O. et al., J. Virol. 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70055; WO 00/70070) which lacks the replication ability. Infection to tissues other than the target tissue and induction of immune response are of concern with such secondary released particles.

Accordingly, the present inventors discovered that paramyxovirus lacking the M gene among the viral envelope genes does

not show particle formation, but does allows for cell fusogenic infection through the formation of a syncytium through the fusion of infected cells and cells contacting these infected cells (WO 00/09700). These M-deficient viruses are replicated in transfected cells, and are delivered to adjacent cells in the presence of trypsin. However, this is a phenomenon that occurs only under conditions where F is cleaved and activated. In viruses comprising the wild-type F protein, transfer of viruses will not occur under conditions without trypsin-like proteases. Thus, the present inventors postulated that a novel vector which does not produce secondary released particles, and which can spread the infection only in a specific tissue, can be developed by modifying the tropism of the F protein in this M-deficient virus. In particular, many infiltrating metastatic cancers are known to have enhanced activity of proteases, such as MMP, uPA, and tPA, which degrade ECM. Accordingly, the present inventors utilized the protease-dependent cell fusogenic infection of this M-deficient SeV and the phenomena of overexpression of MMP, uPA, and tPA in cancers in combination to prepare SeV vectors that specifically infect and spread to invasive metastatic cancers.

10

20

25

30

35

An M-deficient virus lacks the M gene needed for particle formation. Therefore, viral particles are either not released or are extremely suppressed in such a virus. When conventional reconstitution methods are used to produce a recombinant virus having the ability to replicate (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996), RNPs of the M-deficient virus can be prepared but infectious viral particles are not (WO 00/09700). When using the M-deficient vector as a cancer therapeutic agent, it is extremely useful to prepare the M-deficient virus as an infectious viral particle. Therefore, the present inventors developed novel production methods for preparing M-deficient viruses as viral particles.

To achieve the objective - to construct vectors with suppressed VLP release, the present inventors considered the use of temperature-sensitive mutations in the viral gene. Mutant viral strains that can be grown at low but not high temperatures have been reported. The present inventors conceived that a mutant protein, particularly a mutant M protein, which suppresses virion formation

at high temperature, could be used to suppress VLP formation in such a way that virus production could be carried out at a low temperature (for example, at 32°C), but practical application of the virus, such as for gene therapy, could be carried out at a higher temperature (for example, at 37°C). For this purpose, the present inventors constructed a recombinant F gene-deficient Sendai viral vector, which encodes mutant M and mutant HN proteins that have in total six temperature-sensitive mutations reported in M and HN proteins (three for M protein, and three for HN protein). VLP release for this virus was tested, and the level was determined to be about 1/10 or less of that of the wild-type virus. Further, immunostaining with an anti-M antibody was used to analyze M protein subcellular localization in cells in which the Sendai virus vector with suppressed VLP release had been introduced. The results showed that introduction of virus with suppressed VLP release significantly reduced M protein aggregation on cell surfaces as compared to cells containing the introduced wild-type virus. In particular, M protein condensation patterns were extremely reduced at a high temperature (38°C). The subcellular localization of M and HN proteins in cells infected with SeV containing a temperature-sensitive mutant M gene was closely examined using a confocal laser microscope. M protein localization on cell surfaces was significantly reduced, even at a low temperature (32°C), and was observed to have morphology similar to that of a microtubule. At a high temperature (37°C), the Mprotein was localized on the microtubules near the centrosome, that is, near the Golgi body. The addition of a microtubule-depolymerizing agent resulted in the disruption of the M protein localization structure. This occurred both in SeV comprising the temperature-sensitive M gene and in SeV comprising the wild-type M gene. This raised the possibility that M protein actually functions by localizing along microtubules. These findings confirm that the reduced level of secondary particle release in the case of viruses having temperature-sensitive mutations was due to insufficient intracellular localization of the M protein, a step believed to play a central role in particle formation. Thus, VLP formation can be effectively suppressed by preventing the normal intracellular localization of M protein. Furthermore, interaction

10

15

25

35

with microtubules may be important for M protein function. For example, secondary particle release can be reduced through disruption of M protein subcellular localization, a step achieved using a gene mutation or pharmaceutical agent developed to inhibit M protein transport along microtubules from Golgi bodies into the cell. In particular, the present inventors found that recombinant viral vectors whose particle formation ability had been reduced or eliminated could be provided by preparing viral vectors comprising a mutation leading to defective M protein localization.

10

15

20

25

30

35

By deleting the M gene from the virus, the present inventors constructed a virus in which aggregation of M protein on the cell surface is completely suppressed in cells transfected with the virus. For this purpose, the present inventors constructed helper cells that can inducibly express the wild-type M protein that may be used to produce M gene-deficient viruses. By using these cells, collection of viral particles, in which the RNP of F-modified M gene-deficient viruses are enclosed in an envelope comprising the wild-type M protein, was accomplished for the first time. The methods of the present invention enable the production of viral particles at a concentration of 1x 108 PFU/mL or more, and therefore, recombinant viruses sufficient for practical use, particularly clinical use, are provided for the Furthermore, the virus production system of this invention avoids the possibility of contamination by other viruses and enables the production of highly safe, high-titer vectors for gene therapy. A practical F-modified M-deficient paramyxovirus was provided for the first time by using the M-deficient SeV production system of this invention, which supplies the M protein in trans by utilizing M-expressing cells.

The present inventors used infectious viral particles constructed as described above and verified the actual antitumor effect in vivo. M-deficient virus activated by matrix metalloprotease (MMP), which shows enhanced activity in cancer, was administered to mice transplanted with cancer cells, and the virus was confirmed to spread throughout the cancer tissues via cell fusogenic infection. In cancers to which wild-type virus was administered, the virus was limited to the injected site even after several days. In contrast,

the vector of this invention showed high permeability towards cancer tissues, and the vector spread throughout the entire cancer. The suppressive effect of the present vectors against proliferation of cancer was apparent when compared to the controls without virus 5 administration or administration of the wild-type virus. Vectors targeting MMP-expressing cells have also been produced to date using retroviruses (Peng, K.-W. et al., Human Gene Therapy 8, 729-738, 1997; Peng, K.-W. et al., Gene Therapy 6, 1552-1557, 1999; Martin, F. et al., J. Virol. 73, 6923-6929, 1999). However, they utilize a completely different design for the recognition sequence from that of the present invention. Furthermore, the objectives of these reports are specific infection of cancer tissues - that is, only targeting. Thus, vectors that specifically (intracellularly) spread infection through cancer tissues are provided for the first time by this invention.

10

15

20

25

35

Furthermore, the present inventors succeeded in preparing viral particles with uncleaved F protein on the viral surface (F-uncleaved virus) by controlling the addition of protease during viral particle production. As is, these viruses do not have infectivity; however, they display specific infectivity upon treatment with a protease that cleaves the F protein on the viral surface, or upon addition of the viruses to cells in the presence of such protease. Such inducibly infectious viral vectors enable infection of vectors specifically into cancer cells producing a particular protease.

Moreover, the present inventors successfully employed the wild-type F protein in the preparation of a vector comprising a modified F gene to develop a method for producing viral particles utilizing a protease that cleaves the wild-type F protein during vector preparation. According to this method, virus amplification can be performed using helper cells expressing the wild-type F protein and an enzyme, such as trypsin, that cleaves the wild-type F protein. The obtained viral particles comprise the cleaved wild-type F protein in their envelope and have infectivity. However, due to the modified F gene, wherein the cleavage site of the F protein is modified encoded by the viral genome, the infection spreads only in the presence of a particular protease. This method of preparing viruses using the wild-type F protein is advantageous since it allows production of viral particles without depending on the modified F gene to be integrated into the vector genome.

As described above, the present invention provides vectors whose infection spreads only in the presence of a protease expressed in a specific tissue, such as a cancer tissue. The vectors of this invention do not produce significant quantities of viral particles but instead transfer vectors to surrounding cells by cell fusion. The vectors of this invention that acquire infectivity by proteases whose activity is particularly enhanced in cancers have strong suppressive effects toward tumor growth. Thus, gene therapy of cancers using these vectors is considered to be extremely effective.

10

20

25

Therefore, the present invention relates to cell fusion vectors whose protease-dependent tropism has been modified, and methods for producing the same, and such. Specifically, the present invention relates to:

- [1] a complex comprising a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a nucleic acid encoding an M protein is mutated or deleted, and (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded, the complex further comprising the following properties:
- (1) the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the complex has been introduced;
- (2) a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and
- (3) the ability to introduce the RNA into a cell that contacts the cell transfected with the complex in the presence of the protease;
 - [2] the complex of [1], which is a viral particle;
- 30 [3] the complex of [2], further comprising the wild-type F protein;
 - [4] the complex of any one of [1] to [3], wherein the paramyxovirus is Sendai virus;
- [5] the complex of any one of [1] to [4], wherein the protease is a protease whose activity is enhanced in cancer;
 - [6] the complex of any one of [1] to [5], wherein the protease

is a matrix metalloproteinase or plasminogen activator;

10

15

25

- [7] the complex of any one of [1] to [6], wherein the sequence cleaved by the protease comprises Pro-Leu-Gly, Pro-Gln-Gly, or Val-Gly-Arg;
- [8] the complex of any one of [1] to [7], wherein a cytoplasmic domain of the wild-type F protein is partially deleted in the modified F protein;
- [9] the complex of any one of [1] to [8], wherein the modified F protein is fused with an HN protein;
- [10] a method for producing a viral particle which comprises a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a nucleic acid encoding an M protein is mutated or deleted, and (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded; wherein the viral particle: (1) has the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the viral particle has been introduced; (2) shows a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and (3) has the ability to introduce the genomic RNA into a cell that contacts with the cell transfected with the viral particle comprising the genomic RNA in the presence of the protease; wherein the method comprises the steps of:
- (i) amplifying RNP, which comprises the N, P, and L proteins of the paramyxovirus and the genomic RNA, in a cell expressing wild-type M protein of paramyxovirus; and
- (ii) collecting viral particles released into the cell culture supernatant;
- [11] a method for producing a viral particle which comprises a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a conditionally mutated M protein is encoded, and (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded; wherein the viral particle: (1) has the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the viral particle has been introduced; (2) shows a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and (3) has the ability to introduce

the genomic RNA into a cell that contacts with the cell transfected with the viral particle comprising the genomic RNA in the presence of the protease; wherein the method comprises the steps of:

- (i) amplifying RNP, which comprises the N, P, and L proteins of the paramyxovirus and the genomic RNA, in cells under permissive conditions for the mutant M protein; and
- (ii) collecting viral particles released into the cell culture supernatant;
- [12] the method of [10] or [11], wherein step (i) is performed at 35°C or below;

10

15

20

25

30

- [13] the method of [10] or [11], further comprising the step of presenting the protease that cleaves the modified F protein during at least either of steps (i) or (ii); or the step of treating the viral particle collected in step (ii) with the protease;
- [14] the method of [10] or [11], which further comprises the steps of expressing the wild-type F protein of paramyxovirus in the cell during step (i); and presenting the protease that cleaves the wild-type F protein during at least either of steps (i) or (ii); or the step of treating the viral particle collected in step (ii) with the protease;
- [15] a therapeutic composition for cancer comprising the complex of [5] and a pharmaceutically acceptable carrier;
- [16] a recombinant modified paramyxoviral F protein comprising Pro-Leu-Gly, Pro-Gln-Gly, or Val-Gly-Arg at the cleavage site, and showing cell fusogenicity in the presence of matrix metalloproteinase or plasminogen activator;
 - [17] a nucleic acid encoding the protein of [16];
- [18] a viral particle comprising the protein of [16] or a nucleic acid encoding the protein;
- [19] a fusion protein having cell fusogenic activity and comprising the transmembrane regions of the paramyxoviral F protein and HN protein, wherein the proteins are bound to each other on the cytoplasmic side;
- [20] the fusion protein of [19], wherein the sequence of the cleavage site of the protein is substituted with a sequence that is cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein;

[21] a nucleic acid encoding the protein of [19];

[22] a vector which comprising the nucleic acid of [21]; and

[23] a viral particle comprising the protein of [19] or a nucleic acid encoding the protein.

.5

10

15

20

25

30

35

In the present invention, the term "paramyxovirus" refers to viruses that belong to the family Paramyxoviridae, and to viruses derived from them. Paramyxovirus is a virus group characterized by a non-segmented negative strand RNA genome, and including the subfamily Paramyxovirinae (comprising the genus Paramyxovirus (also called the genus Respirovirus, the genus Rubulavirus and the genus Morbillivirus), and the subfamily Pneumovirinae (comprising the genus the genus Metapneumovirus). Pneumovirus and Specifically, paramyxoviruses to which the present invention can be applied include the Sendai virus, Newcastle disease virus, mumps virus, measles virus, RS virus (Respiratory syncytial virus), rinderpest virus, distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and human parainfluenza virus type 1, 2, and 3, etc. More specifically, for example, the Sendai human parainfluenza virus-1 virus (SeV), (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin molbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), Hendra virus (Hendra), Nipah virus (Nipah), human parainfluenza virus-2 (HPIV-2), simian parainfluenza virus 5 (SV5), human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a), human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b), mumps virus (Mumps), and Newcastle disease virus (NDV) are included. More preferably, examples include viruses selected from the group consisting of Sendai virus (SeV), human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin molbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), Hendra virus (Hendra), and Nipah virus (Nipah). The viruses of the present invention preferably belong to the subfamily Paramyxovirinae (comprising the genus Respirovirus, the genus Rubulavirus and the genus Morbillivirus), and more preferably to the genus *Respirovirus* (also called the genus

Paramyxovirus). Examples of viruses of the genus Respirovirus to which the present invention can be applied include human parainfluenza virus type 1 (HPIV-1), human parainfluenza virus type 3 (HPIV-3), bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3), Sendai virus (also called murine parainfluenza virus type 1), simian parainfluenza virus type 10 (SPIV-10), etc. The paramyxovirus of the present invention is most preferably the Sendai virus. These viruses may be derived from natural strains, wild-type strains, mutant strains, laboratory-passaged strains, artificially constructed strains, etc.

10

15

20

25

30

35

The phrases "recombinant protein" and "recombinant virus" refer to proteins and viruses produced via recombinant polynucleotides, respectively. The phrase "recombinant polynucleotide" refers to a polynucleotide that is not bonded as in nature. Specifically, recombinant polynucleotides comprise polynucleotides polynucleotide strand has been recombined artificially, and synthetic polynucleotides, Recombinant polynucleotides can be produced using conventional gene recombination methods by combining the processes of polynucleotide synthesis, nuclease treatment, ligase treatment, Recombinant proteins can be produced by expressing recombinant polynucleotides encoding the proteins. Recombinant viruses can be produced by the steps of: expressing a polynucleotide encoding the viral genome, which is constructed by genetic engineering; and then reconstituting the virus.

The term "gene" used herein refers to a genetic substance, which includes nucleic acids such as RNA, DNA, etc. In the present invention, a nucleic acid encoding a protein is called a protein gene. However, a gene need not necessarily encode a protein; for example, it may encode a functional RNA such as a ribozyme, antisense RNA, etc. A gene may have a naturally derived or artificially designed sequence. Herein, the term "DNA" encompasses both single-stranded DNA and double-stranded DNA. The phrase "encoding a protein" indicates that a polynucleotide comprises an antisense or sense ORF, which encodes a protein amino acid sequence, such that the polynucleotide can be expressed under suitable conditions.

The present invention provides cell fusion vectors having replicative ability whose protease-dependent tropism has been

modified. In an intrahost environment, such vectors do not release significant quantities of virus-like particles after transfection into cells, and infiltrate into surrounding cells only in the presence of a certain protease. Specifically, the vectors of the present invention include:

a complex which comprises a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a nucleic acid encoding an M protein is mutated or deleted, and wherein (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded, and which comprises the following properties:

10

20

25

30

35

- (1) the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the complex has been introduced;
- (2) a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and
- (3) the ability to introduce the RNA into a cell that contacts with the cell transfected with the complex only in the presence of the protease. Since such a complex has the function of replicating the genomic RNA and transferring it to neighboring cells, it is also called a vector in the present invention. The term "vector" refers to carriers that transfer nucleic acids into cells.

More specifically, the above complex comprises the genomic RNA of paramyxovirus and viral proteins that bind to this RNA. The complexes of the present invention can consist of, for example, the genomic RNA of paramyxoviruses, and the viral proteins, i.e., the ribonucleoprotein (RNP). RNPs can be introduced into target cells, for example, in combination with a desired transfection reagent. Such RNPs are, more specifically, complexes comprising the genomic RNAs of paramyxoviruses, N proteins, P proteins, and L proteins. When RNPs are introduced into cells, the viral proteins work to transcribe cistrons encoding viral proteins from the genomic RNA; in addition, the genome itself is replicated and daughter RNPs are produced. Replication of the genomic RNA can be confirmed by detecting an increase in RNA copy number using RT-PCR, Northern hybridization, or such.

More preferably, the above-described complex is a virus particle of a paramyxovirus. The phrase "virus particle" refers to a

nucleic-acid-containing minute particle that is released from a cell by the action of viral proteins. Virus particles can take various forms, e.g., that of spheres or rods, depending on the viral species. They are significantly smaller than cells, generally in the range of about 10 nm to about 800 nm. Paramyxovirus viral particles are structured such that the above-mentioned RNP comprises the genomic RNA and viral proteins, and is enclosed by a lipid membrane (or envelope) derived from the cell membrane. The viral particles may or may not show infectivity (infra). For example, some viral particles do not show infectivity as they are, but acquire infectivity upon specific treatment.

10

15

25

35

The phrase "genomic RNA of paramyxovirus" refers to RNA that has the ability to form RNP with proteins of paramyxovirus and express genes from the genome using these proteins to replicate the nucleic acids and form daughter RNPs. The paramyxovirus has as its genome a negative single-stranded RNA, a kind of RNA that encodes genes in the antisense mode. In general, paramyxovirus genomes comprise viral genes in antisense series between the 3'-leader region and the 5'-trailer region. Between the open reading frames (ORFs) for each gene, a series of sequences is present: a transcription termination sequence (E sequence), an intervening sequence (I sequence), and a transcription initiation sequence (S sequence). Thus, the RNA encoding each gene's ORF is transcribed as a separate cistron. Genomic RNAs included in the vectors of this invention encode (in antisense mode) nucleocapsid (N), phosphor (P), and large (L) proteins. These proteins are necessary for the expression of genes encoded by the RNAs, and for autonomous replication of the RNA themselves. Furthermore, the RNAs encode the fusion (F) protein, which induces cell membrane fusion necessary for spreading the RNA to neighboring cells, in an antisense orientation. Preferably, the genomic RNAs further encode the hemagglutinin-neuraminidase (HN or H) protein in an antisense orientation. However, in certain cells, the HN protein is not necessary for infection (Markwell, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(4), 978-982, 1985) and infection is accomplished with the F protein alone. Furthermore, vectors can be infected to cells by using proteins other than HN that binds to cells, combined with the F protein. Therefore, the vectors of this invention can be constructed using genomic RNAs that do not encode the HN gene.

Genes of viruses belonging to the subfamily Paramyxovirinae are represented in general as below: The N gene is also generally described as the "NP".

Genus Respirovirus	Ν̈́P	P/C/V	M	F	HN	- '.'	$\mathbf{L}_{_{\perp}}$
Genus Rubulavirus	NP	P/V	М	F	HN	(SH)	L
Genus Morbillivirus	NP.	P/C/V	М	F	Н		L

For example, database accession numbers for nucleotide sequences of Sendai virus genes classified as Respiroviruses within the Paramyxoviridae family are: M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046 and X17218 for the NP gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007 and X17008 for the P gene; D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584 and X53056 for the Mgene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 and X02131 for the F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808 and X56131 for the HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587 and X58886 for the L gene. Accession numbers for virus genes encoded by additional viruses are exemplified below: AF014953 (CDV), X75961 (DMV), D01070 (HPIV-1), M55320 (HPIV-2), D10025 (HPIV-3), X85128 (Mapuera), D86172 (Mumps), K01711 (MV), AF064091 (NDV), X74443 (PDPR), X75717 (PDV), X68311 (RPV), X00087 (SeV), M81442 (SV5), and AF079780 (Tupaia) for Ngene, X51869 (CDV), Z47758 (DMV), M74081 (HPIV-1), X04721 (HPIV-3), M55975 (HPIV-4a), M55976 (HPIV-4b), D86173 (Mumps), M89920 (MV), M20302 (NDV), X75960 (PDV), X68311 (RPV), M30202 (SeV), AF052755 (SV5), and AF079780 (Tupaia) for P gene; AF014953 (CDV), Z47758 (DMV), M74081 (HPIV-1), D00047 (HPIV-3), ABO16162 (MV), X68311 (RPV), AB005796 (SeV), and AF079780 (Tupaia) for C gene; M12669 (CDV), Z30087 (DMV), S38067 (HPIV-1), M62734 (HPIV-2), D00130 (HPIV-3), D10241 (HPIV-4a), D10242 (HPIV-4b), D86171 (Mumps), AB012948 (MV), AF089819 (NDV), Z47977 (PDPR), X75717 (PDV), M34018 (RPV), U31956 (SeV), and M32248 (SV5) for M gene; M21849 (CDV), AJ224704 (DMV), M22347 (HPN-1), M60182 (HPIV-2), X05303 (HPIV-3), D49821 (HPIV-4a), D49822 (HPIV-4b), D86169

20

25

30

(Mumps), AB003178 (MV), AF048763 (NDV), Z37017 (PDPR), AJ224706 (PDV), M21514 (RPV), D17334 (SeV), and AB021962 (SV5) for F gene; AF112189 (CDV), AJ224705 (DMV), U709498 (HPIV-1), D000865 (HPIV-2), AB012132 (HPIV-3), M34033 (HPIV-4A), AB006954 (HPIV-4B), X99040 (Mumps), K01711 (MV), AF204872 (NDV), Z81358 (PDPR), Z36979 (PDV), AF132934 (RPV), U06433 (SeV), and S76876 (SV-5) for HN (H or G) gene. More than one strain is known for each of the viral species, and genes comprising sequences other than those shown above may exist depending on different strains.

10

15

20

25

30

35

The ORFs of these viral proteins are positioned in an antisense orientation via the above-described E-I-S sequence on the genomic RNA. On the genomic RNA, the ORF closest to the 3'-end requires only the S sequence between the 3'-leader region and the ORF, and not the E and I sequences. On the other hand, the ORF closest to the 5'-end on the genomic RNA requires only the E sequence between the 5'-trailer region and the ORF, and not the I and S sequences. Two ORFs can be transcribed as the same cistron using sequences such as IRES. In such cases, the E-I-S sequence is not necessary between these two ORFs. In the wild-type paramyxovirus, a typical RNA genome has a 3'-leader region followed by a sequence of six ORFs encoding the N, P, M, F, HN, and L proteins in this order in antisense orientation, followed by a 5'-trailer region at the other end. On the genomic RNAs of this invention, the configuration of the viral gene is not limited thereto; however, it is preferred to localize behind the 3' leader region the ORFs encoding the N, P, (M,) F, HN, and L proteins in this order followed by a 5'-trailer region similar to the wild-type virus. In a certain type of paramyxovirus, the number of viral genes is not six. However, even in such cases, each viral gene can be positioned similarly to the wild-type as described above, or they can be appropriately changed. The ORF of the M protein will be described later. However, according to one embodiment of the vectors of this invention, the ORF may be excluded or may encode a mutant M protein. Furthermore, in another embodiment of the vector of this invention, the cleavage site of the F protein encoded by the genome is modified to a sequence that is cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein (infra). The genomic RNA of this invention may also encode one or more foreign genes. Any objective gene desired to be expressed in a target cell can be used as the foreign gene. The foreign gene is preferably inserted at sites in the noncoding region of the genome. For example, it may be inserted between the 3'-leader region and viral protein ORF closest to the 3'-end, between each of the viral protein ORFs, and/or between the viral protein ORF closest to the 5'-end and the 5'-trailer region. In an M gene-deficient genome, insertion can be made in the deficient region. When transferring a foreign gene to a paramyxovirus, preferably, the polynucleotide of the insertion fragment placed into the genome has a chain length that is a multiple of 6 (Journal of Virology 67(8), 4822-4830, 1993). The E-I-S sequence is placed between the inserted foreign gene and the viral ORF. Alternatively, the foreign gene may be inserted via IRES.

10

15

20

25

30

35

The expression level of the foreign gene can be adjusted by the type of transcription initiation sequence added upstream of the gene (the 3'-side of the negative strand) (WO 01/18223). Furthermore, the expression level can be regulated depending on the insertion position of the foreign gene in the genome. The closer the foreign gene is to the 3'-end of the negative strand, the higher the expression level of the foreign gene will be; similarly, the closer the foreign gene is to the 5'-end, the lower the expression level becomes. Therefore, the insertion site of the foreign gene can be adjusted appropriately to obtain a desired expression level of the foreign gene and an optimized combination with the upstream and downstream genes encoding viral proteins. Generally, high expression levels are considered advantageous for foreign genes. Therefore, the foreign gene is preferably linked to a highly efficient transcription initiation sequence, and inserted near the 3'-end of the negative strand genome. More specifically, it is preferably inserted between the 3'-leader region and the viral protein ORF closest to the 3'-end. Alternatively, the foreign gene may be inserted between the viral gene ORF closest to the 3'-end and the ORF of the secondly closest gene. Conversely, when high expression level of the transferred gene is not preferred, the expression level from the viral vector can be reduced by, for example, designing the insertion position of the gene in the vector to be as close as possible to the 5'-side of the negative strand genome, or using a transcription initiation sequence with a low efficiency, for an appropriate effect to arise.

Any viral genes included in the vector of this invention may be modified from wild-type genes in order to, for example, reduce the immunogenicity of the viral proteins, or to enhance RNA transcription and replication efficiency. Specifically, paramyxoviral vectors, for example, transcription or replication functions can be enhanced by modifying at least one of the replication factors: N, P, and L genes. The structural protein HN comprises both hemagglutinin and neuraminidase activities. If, for example, the activity of the former can be reduced, the stability of the virus in blood can be enhanced. On the other hand, if, for example, the activity of the latter can be modified, infectivity can be regulated. In addition, membrane fusion and/or particle formation ability can be regulated by modifying the F protein and its domains, apart from For example, by using analysis of the the cleavage site. antigen-presenting epitopes and such of possible cell surface antiquenic molecules, such as the F and HN proteins, a viral vector with weakened antigen-presenting ability against these proteins can be created.

10

15

20

25

30

Vectors with deficient accessory genes can be used as the vectors of the present invention. For example, by knocking out the V gene, an SeV accessory gene, SeV pathogenicity to hosts such as mice can be markedly decreased without damaging gene expression and replication in cultured cells (Kato, A. et al., J. Virol. 71, 7266-7272, 1997; Kato, A. et al. EMBO J. 16, 578-587, 1997,; Curran, J. et al., WO 01/04272, EP 1067179). Such attenuated vectors are preferred as viral vectors for in vivo or ex vivo nontoxic gene transfer.

In a preferred embodiment, the complexes of the present invention are substantially homogeneous. The phrase "substantially homogeneous" complex refers to complexes that are isolated from a paramyxoviral RNP or viral particle which is not a complex of this invention. That is, the substantially homogeneous complexes of this invention do not comprise other paramyxovirus RNP or viral particles that possess particle-forming ability. Herein, the phrase "particle-forming ability" refers to the ability of a vector to release

infectious and/or noninfectious viral particles (called virus-like particles) in cells infected with the viral vector, a process referred to as "secondary release". Furthermore, the complexes of this invention with modified cleavage site of the F protein do not comprise viral RNPs comprising genes that encode the wild-type F protein or an F protein having a similar fusion activity thereto in the genome, nor viral particles comprising this genome.

10

15

20

25

30

35

According to an embodiment of this invention, the cleavage site sequence of the F protein encoded by the above-mentioned genomic RNA is substituted by a sequence that is cleaved by another protease. The F protein of paramyxovirus (F0) itself does not show cell membrane fusion activity in its original form. However, upon cleavage of the extracellular domain of the FO fragment (or the outer domain of the viral particle), it exhibits its fusion activity. The two F protein fragments, N-terminal side and C-terminal side fragments, resulting from the cleavage are called F1 and F2, respectively, and are bonded together via a disulfide bond. Cleaving the F protein involves cleaving the F protein on the membrane at a domain outside the membrane, thereby resulting in the generation of fragments with cell fusogenicity. The phrase "cleavage site sequence" refers to an amino acid sequence required for the cleavage by a protease or essential residues therein. The cleavage sites of the paramyxovirus F protein are known in the art, and may be cleaved by trypsin-like intracellular proteases, such as furin.

Furins generally exist in the Golgi body of most cells. The recognition motif of furin is Arg-X-Lys/Arg-Arg (RXK/RR) (separation of two amino acids by "/" means either one of the amino acids). Highly pathogenic Human PIV3 (RTKR), SV5 (RRRR), Mumps virus (RHKR), NDV (virulent strain) highly virulent strain (RQR/KR), Measles virus (RHKR), RS virus (RKRR), and such comprise the sequences of these motifs at their cleavage sites. The F protein of highly virulent strains is sensitive to proteases present in all cells, and viruses of this strain undergo multi-step proliferation upon cleavage of the F protein in all organs. Thus, the infection of these viruses is fatal. On the other hand, Sendai virus (PQSR), Human PIV1 (PQSR), and NDV (avirulent strain) weakly virulent strain (K/RQG/SR) with low

virulence do not comprise this motif, but only Arg, which is the serine protease recognition sequence. The sequences of the F protein cleavage sites of paramyxovirus are well analyzed, and those skilled in the art can recognize them by appropriately referring to the literature (see, for example, "Uirusu-gaku (Virology)", Hatanaka, M. ed., Tokyo, Asakura Shoten, 247-248, 1997).

10

15

20

25

30

35

Furthermore, a cleavage site can be confirmed by identifying the cleavage site of an F protein of a virus grown in cell's, tissues, individuals, or such where the paramyxovirus can proliferate, or the F protein collected by expressing them in these cells, individuals, or such. Alternatively, the F protein can be cleaved artificially and identified by treating the F protein expressed on the cell surface with a protease such as trypsin, which cleaves the cleavage site of the protein. According to an embodiment of this invention, the F protein comprises modified F protein cleavage site that may be cleaved by another protease. To accomplish this, the native cleavage sequence of the F protein is modified by replacing, deleting, and/or inserting one or more amino acids to reconstitute a sequence that is cleaved by another protease. Modification of the amino acid sequence can be performed by conventional site-directed mutagenesis methods. addition, the modified F protein may maintain the property of being cleaved by proteases (such as trypsin) which cleave the wild-type F protein (see Examples). Vectors encoding such modified F proteins show enhanced protease-dependent tropism as compared to the wild-type F protein.

Sequences cleaved by another protease may be those cleaved by a preferable proteases. For example, sequences that are cleaved by a protease selectively expressed in tissues or cells which serve as the preferred target for vector introduction may be used (WO 01/20989). By designing a vector using an F protein gene comprising a sequence cleaved by a protease that is active in the target tissues as described above, the excellent property for proliferating and transferring the vector specifically to surrounding cells under conditions where this protease activity exists can be realized. For example, by employing a cleavage sequence of a protease specifically expressed or activated in particular tissues, vectors that specifically infiltrate only

within those tissues may be constructed. Furthermore, by utilizing the cleavage sequence of a protease that is specifically expressed or activated under certain conditions, such as a disease, vectors that specifically infiltrate under such conditions (for example, bnly within the lesion of a specific disease) can be constructed. Both intracellular and extracellular proteases may be utilized. For example, proteases secreted to the cell exterior, and membrane proteases expressed on the membrane surface are preferred. Alternatively, the selected protease may be any desired protease that exists within the transport pathway of the F protein, starting from intracellular translation to secretion on the cell surface.

.10

20

25

30

35

A large number of disorders are caused by aberrant expression of protease genes, including, for example, disorders belonging to all categories of general pathology, such as metabolic disorders, circulatory disorders, inflammation and immunologic disorders, infections, and malignant tumors. Specific examples include calpain in muscular dystrophy, destruction of the ubiquitin-proteasome system in autoimmune diseases and neural disorders, decreased expression of neprilysin in Alzheimer's disease, enhanced expression of MMP in infiltration and metastasis of cancer, pathogen-derived protease from pathogenic microorganisms, serine protease in hemostatic mechanism, and aminopeptidase in the placenta.

Calpain, a calcium-dependent cysteine protease, has been studied as an enzyme involved in muscle proteolysis of muscular dystrophy. Calpain undergoes a specific activation mechanism in which activation occurs due to binding with calcium, and is considered to trigger muscle proteolysis by limited intracellular degradation of proteins important for structural maintenance of skeletal muscles, such as α -actinin, troponin, and connectin. Regarding the cleavage sequence for calpain (Karlsson, J.O. et al., Cell Biol. Int. 24, 235-243, 2000), Leu-Leu-Val-Tyr and such are used as the degradation substrate.

The ubiquitin-proteasome system is a selective and active intracellular proteolysis mechanism, and an important cell function regulatory system for signal transduction, cell cycle, and such. Ubiquitin consists of 76 amino acids, and is covalently bonded to a protein by continuous catalytic action via the ubiquitin activating

enzyme (E1), ubiquitin binding enzyme (E2), and ubiquitin ligase (E3). The ubiquitinated protein is degraded by the 26S proteasome. Several hundred types of E3 enzymes are known to exist and are categorized roughly into HECT type and RING finger type. Abnormal activities of these enzymes have been implicated in a large number of diseases. For example, Leu-Leu-Val-Tyr is used as the degradation substrate of the 26S proteasome (Reinheckel, T. et al., Arch. Biochem. Biophys. 377, 65-68, 2000).

Articular disorders, such as chronic rheumatoid arthritis, cause dyskinesia by the destruction of articular cartilage tissues. The regeneration ability of articular cartilage is extremely low, and destruction of the cartilage conformation by extracellular matrix degradation leads to progressive articular destruction. The relationship between MMP and "a disintegrin and metalloproteinase" (ADAM) molecule of related gene family is of interest in such destruction of the extracellular matrix of the cartilage. In particular, ADAMTS (ADAM with thrombospondin motif) molecule is considered to be an enzyme necessary for degrading cartilage proteoglycan (aggrecan) (Tortorella, M.D. et al., Science 284, 1664-1666, 1999). The sequence leading to aggrecan degradation by ADAMTS has been identified (Tortorella, M.D. et al., J. Biol. Chem. 275, 18566-18573, 2000).

10

15

20

25

35

Using the recognition sequences of these proteases, vectors specific to tissues that express these proteases can be prepared.

Particularly preferred protease cleavage sequences of this invention include those of proteases whose activity is enhanced in cancer. By constructing vectors using such sequences, vectors that specifically infect cancer tissues can be constructed. Such vectors are extremely useful as gene transfer vectors for cancer therapy. Proteases with "enhanced activity" in cancer are those that show enhanced activity in certain cancer tissues or cancer cells as compared to the activity in the corresponding normal tissues or normal cells. Herein, the phrase "enhanced activity" includes enhancement of the protease expression level and/or activity itself. The protease expression level can be measured by, for example, Northern hybridization using gene fragments of the protease as the probe, RT-PCR

using a primer that specifically amplifies the protease gene, or Western blotting, ELISA, and immunoprecipitation using antibodies against the protease. The activity of the protease can be determined by degradation assay using substrates of the protease. Many in vivo proteases whose activity is regulated by various inhibitory factors are known in the art. The activity level of proteases can also be determined by measuring the expression level of these inhibitory factors.

10

15

20

25

35

For example, the extracellular matrix (ECM) degradation enzyme activity is particularly enhanced in metastatic cancer (Nakajima, M. and Chop, A.M., Semin. Cancer Biol. 2, 115-127, 1991; Duffy, M.J., Clin. Exp. Metastasis 10, 145-155, 1992; Nakajima, M. "Extracellular matrix degradation enzyme (Japanese)", Seiki, M. ed., "Malignant transformation and metastasis of cancer", Chugai Igaku, 124-136, 1993). In animals, matrices comprising proteins such as collagen and proteoglycan are formed in the space between cells. Specifically known components of the extracellular matrix include collagen, fibronectin, laminin, tenascin, elastin, proteoglycan, and such. These ECMs have the function of regulating adhesion, development, transfer, and such of cells, as well as regulating the distribution and activity of soluble factors via binding thereto. Infiltration of ECM by ECM degradation enzymes is deeply involved in cancer metastasis, and many reports have demonstrated that inhibitors of ECM degradation enzymes can inhibit metastasis or infiltration to the basal membrane. Vectors that specifically infect and infiltrate cancer tissues can be constructed by encoding a modified F protein having a recognition sequence for cleavage by ECM degradation enzyme at its cleavage site.

ECM degradation enzymes are categorized into aspartic acid proteases, cysteine proteases, serine protease, and metalloproteases, depending on the kind of catalytic residues at their active center. In particular, for ECM degradation in vivo, serine proteases and metalloproteases, which are neutral proteases, play a central role. Serine proteases are widely distributed in microorganisms, animals, plants, and such. In higher animals, they are involved in many biological reactions, including, for example, food digestion, blood

coagulation, fibrinolysis, immune complement reaction, cell proliferation, ontogeny, differentiation, senescence, cancer metastasis, and such. Furthermore, the activity of serine protease is generally regulated by a serine protease inhibitor (serpin) which generally exists within plasma and tissues, and quantitative or qualitative abnormalities of the inhibitor are known to cause inflammation and such.

10

15

25

30

35

ECM-degrading serine proteases include cathepsin G, elastase, plasmin, plasminogen activator, tumor trypsin, chymotrypsin-like neutral proteinase, thrombin, etc. Plasmin is produced by limited degradation of plasminogen existing in vivo in the inactive form. This limited degradation is regulated by plasminogen activator (PA) and its inhibitor, plasminogen activator inhibitor (PAI). comprise tissue PA (tPA), which is involved in blood coagulation, and urokinase PA (uPA), which is related to ECM degradation (Blasi, F. and Verde, P., Semin. Cancer Bio. 1, 117-126, 1990). The function of these two PAs are inhibited through the binding of PAI (Cajot, J.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6939-6943, 1990; Baker, M.S. et al., Cancer Res. 50, 4676-4684, 1990). uPA can function while being bound to a uPA receptor (uPAR) on the cell surface. Plasmin degrades fibronectin, tenascin, laminin, and such, but fails to directly degrade collagen. However, it indirectly degrades collagen by activating the collagen degradation enzyme via cleavage of a portion of the precursor of the enzyme. These often show enhanced activity in cancer cells, and correlate well with metastatic ability (Tanaka, N. et al., Int. J. Cancer 48, 481-484, 1991; Boyd, D. et al., Cancer Res. 48, 3112-3116, 1988; Hollas, W. et al., Cancer Res. 51, 3690-3695, 1991; Correc, P. et al., Int. J. Cancer 50, 767-771, 1992; Ohkoshi, M. et al., J. Natl. Cancer Inst. 71, 1053-1057, 1983; Sakaki, Y. et al., New Horizon for Medicine (Japanese) 17, 1815-1821, 1985).

Many studies have been carried out on the cleavage sequences of uPA and tPA (Rijken, D.C. et al., J. Biol. Chem. 257, 2920-2925, 1982; Wallen, P. et al., Biochim. Biophys. Acta 719, 318-328, 1982; Tate, K.M. et al., Biochemistry 26, 338-343, 1987). The commonly used substrate sequences include VGR (Dooijewaard, G., and KLUFT, C., Adv. Exp. Med. Biol. 156, 115-120, 1983) and Substrate S-2288 (Ile-Pro-Arg)

(Matsuo, O. et al., Jpn. J. Physiol. 33, 1031-1037, 1983). Butenas et al. used 54 kinds of fluorescent substrates to identify sequences highly specific to tPA (Butenas, S. et al., Biochemistry 36, 2123-2131, 1997), and demonstrated that two sequences, FPR and VPR, show high degradation activity against tPA. Therefore, these sequences are particularly preferred in the present invention.

Other ECM degradation enzymes are categorized as cysteine protease or aspartic protease. They are also involved in the metastasis and infiltration of cancer. Specific examples include: cathepsin B (Sloane, B.F., Semin. Cancer Biol. 1, 137-152, 1990) using proteoglycan, fibronectin, collagen, procollagenase laminin, (activated by degradation), and such as substrates; cathepsin L (Kane, S.E. and Gottesman, M.M., Semin. Cancer Biol. 1, 127-136, 1990) using elastin, proteoglycan, fibronectin, laminin, elastase (activated), and such as substrates; and cathepsin D (Rochefort, H., Semin. Cancer Biol. 1, 153-160, 1990) using laminin, fibronectin, proteoglycan, and cathepsin B and L (activated) as substrates. Cathepsin B and L in particular are highly expressed in breast cancer tissues (Spyratos, F. et al., Lancet ii, 1115-1118, 1989; Lah, T.T. et al., Int. J. Cancer 50, 36-44, 1992), and colon cancer carcinoma (Shuja, S. et al., Int. J. Cancer 49, 341-346, 1991). The disruption of balance between them and their inhibitory factors has been suggested to be involved in malignant transformation of cancer (Sloane, B.F., Semin. Cancer Biol. 1, 137-152, 1990; Kane, S.E. and Gottesman, M.M., Semin. Cancer Biol. 1, 127-136, 1990).

10

15

20

25

30

35

Metalloproteinase is a metalloenzyme comprising a metallic element such as Zn at its active center. Reported metalloproteinases include caspase, amino peptidase, angiotensin I converting enzyme, and collagenase. Regarding metalloproteinases that degrade ECM, 16 kinds or more of matrix metalloproteinases (MMP) have been reported. Representative MMPs include collagenase-1, -2, and -3 (MMP-1, -8, and -13), gelatinase A and B (MMP-2 and -9), stromelysin 1, 2, and 3 (MMP-3, -10, and -11), matrilysin (MMP-7), and membrane metalloproteinases (MT1-MMP and MT2-MMP). In general, MMP has Zn²⁺ at its active center, and Ca²⁺ is required for its enzyme activity. Furthermore, MMP is secreted as a latent enzyme (referred to as latent

MMP or ProMMP), is activated outside the cell, and degrades various ECMs existing in vivo. Moreover, the activity of MMPs is inhibited by a common inhibitor, namely, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP). Other examples of ECM degradative metalloproteinases include amino peptidase, such as amino peptidase N/CD13 and aminopeptidase B that degrade ECM component proteins. According to experiments using inhibitors, all of these proteinases have been reported to be deeply involved in cancer.

Among these proteinases, collagenases (e.g., MMP-1, -8, and -13) cleave fibrous collagens - type I, II, and III collagen molecules 10 - at specific sites. Two types of gelatinase, gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9), are known. Gelatinase is also called type IV collagenase, and degrades type V collagen and elastin in addition to type IV collagen, the major component of basal membranes. Furthermore, MMP-2 is known to cleave type I collagen at the same 15 site as MMP-1. MMP-9 does not degrade laminin and fibronectin; however, MMP-2 degrades them. Stromelysins (MMP-3 and -10) accept and degrade a broad range of substrates and degrade proteoglycan; type III, IV, and IX collagen; laminin; and fibronectin. Matrilysin (MMP-7) is a 20 molecule that lacks the hemopexin domain, has a substrate specificity identical to that of MMP-3, and particularly high degradation activity for proteoglycan and elastin. Membrane-type metalloproteinases (MT-MMPs) (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP, MT5-MMP, and MT6-MMP) comprise a transmembrane structure. MT-MMPs have an insertion 25 sequence (approximately ten amino acids) between the propeptide domain and the active site. This insertion sequence comprises Arg-Xaa-Lys-Arg (Xaa is any amino acid), and, during transportation process to the cell membrane, is activated through cleavage by furin, an intracellular processing enzyme. Known MT-MPPs 30 include MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16), MT4-MMP (MMP-17), MT5-MMP (MMP-23), and MT-6-MMP (MMP-25). For example, MT1-MMP degrades type I, II, and III collagens, and MT3-MMP degrades type III collagen.

Overexpression of MMP is known to widely occur in cancer cells.

They are categorized into those caused by the cancer itself and by cancer interstitial cells. For example, interstitial collagen

degrading collagenase (MMP-1) is involved with infiltration of cancer cells, and its activity level correlates with metastaticity in colon cancer and such (Wooley, D.E., Cancer Metastasis Rev. 3, 361-372, 1984; Tarin, D. et al., Br. J. Cancer 46, 266-278, 1982). Furthermore, activities of type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) are highly correlated with metastatic ability of various epithelial cancers (Liotta, L.A. and Stetler-Stevenson, W.G., Semin. Cancer Biol. 1, 99-106, 1990; Nakajima, M. Experimental Medicine 10, 246-255, 1992). Moreover, stromelysin (MMP-3) is also known to be correlated with malignant alteration of dermal epithelial tumor (Matrisian, L.M. and Bowden, G.T., Semi. Cancer Biol. 1, 107-115, 1990). Stromelysin-3 (MMP-11) has been observed to be highly expressed in breast cancer and colon cancer (Basset, T. et al., Nature 348, 699-704, 1990; Porte, H. et al., Clin. Exp. Metastasis 10 (Suppl. 1), 114, 1992).

.10

15

20

25

30

35 .

Many cleavage substrates for MMP are known. Examples of substrate sequences that are degraded by all MMPs include PLGLWAR (Bickett, D.M. et al., Anal. Biochem. 212, 58-64, 1993), GPLGMRGL (Deng, S.J. et al., J. Biol. Chem. 275, 31422-31427, 2000), PQGLEAK (Beekman, B. et al., FEBS Lett. 390, 221-225, 1996), RPKPVEWREAK (Beekman, B. et al., FEBS Lett. 418, 305-309, 1997), and PLALWAR (Jacobsen, E.J. et al., J. Med. Chem. 42, 1525-1536, 1999). Cleavage substrates of MMP-2 and -9 include PLGMWS (Netzel-Arnett, S. et al., Anal. Biochem. 195, 86-92, 1991) and PLGLG (Weingarten, H. et al., Biochemistry 24, 6730-6734, 1985).

Recently, phage-displayed peptide library screening has elucidated the degradation substrate sequences for MMP-9 (Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. 276, 20572-20578, 2001), MMP-2 (Chen, E.I. et al., J. Biol. Chem. 277, 4485-4491, 2002), and MT1-MMP (Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. In JBC Papers in Press, April 16, 2002, Manuscript M111574200). In these articles, identified amino acid sequences are categorized into four groups depending on the presence or absence of degradation ability by three MMPs. Group IV includes sequences that are specifically degraded by MT1-MMP, and regarding sequences lacking Arg, VFSIPL and IKYHS sequences are mentioned as substrates that are not degraded by MMP-9 and MMP-2, but are degraded by MT-MMP alone.

For example, the cleavage sequence of MMP-9 is Pro-X-X-Hy (wherein, X represents an arbitrary residue; Hy, a hydrophobic residue), with Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) being particularly preferred. A more specific example includes Pro-Arg-(Ser/Thr)-Hy-(Ser/Thr) (cleavage occurs between X and Hy residues). Examples of Hy (hydrophobic residues) include Leu, Val, Tyr, Ile, Phe, Trp, and Met, but are not limited thereto. Other cleavage sequences have been also identified (for example, see Group I, II, IIIA, and IIIB in the following literature; Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. 276, 20572-20578, 2001), and any desired sequence may be used. above-mentioned Pro-X-X-Hy may be used for MMP-2, and in addition, (Ile/Leu)-X-X-Hy, Hy-Ser-X-Leu, and His-X-X-Hy (see, for example, Group I, II, III, and IV in the following literature; Chen, E.I. et al., J. Biol. Chem. 277, 4485-4491, 2002) may also be used. The cleavage sequence for the MMP family comprising MMP-7, MMP-1, MMP-2, MMP-9, MMP-3, and MT1-MMP'(MMP-14) can be appropriately selected, for example, by referring to the sequences of natural substrate proteins or by screening a peptide library (Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19, 661-667, 2001; Woessner, J.F. and Nagase, H., Matrix metalloproteinases and TIMPs. (Oxford University Press, Oxford, UK, 2000); Fernandez-Patron, C. et al., Circ. Res. 85, 906-911, 1999; Nakamura, H. et al., J. Biol. Chem. 275, 38885-38890, 2000; McQuibban, G.A. et al., Science 289, 1202-1206, 2000; Sasaki, T. et al., J. Biol. Chem. 272, 9237-9243, 1997). Examples of the eight amino acid sequences P4-P3-P2-P1-P1'-P2'-P3'-P4' (cleavage occurs between P1 and P1') of the cleavage site include VPMS-MRGG for MMP-1, RPFS-MIMG for MMP-3, VPLS-LTMG for MMP-7, and IPES-LRAG for MT1-MMP, but are not limited thereto. PLAYWAR (Nezel-Amett, S. et al., Anal. Biochem. 195, 86, 1991) is an example for MMP-8. Various synthetic substrates of MMP are available, and can be compared to each other (see, for example, each of the MMP substrates in the Calbiochem® catalog, Merck).

.10

15

20

25

30

35

Generally, MMP activity in tissues is regulated through the process of: latent enzyme production, latent enzyme activation, and active enzyme inhibition by inhibitors. MMP activity is involved in various physiological phenomena, such as development and ovulation, fertilization, implantation to the endometrium, and wound healing.

Disorder in the regulation of MMP activity contributes to various pathologies including, for example, infiltration and metastasis of cancer cells, arthritis, gingivitis, arteriosclerosis, tumor, and fibrosis. For example, gellatinases (MMP-2 and -9) that degrade the basal membrane components are known to be important for metastasis of cancer. MMP-2 is activated by cleavage of pro-MMP-2 by MT1-MMP. On the other hand, a pathway for the activation of MMP-9 exists wherein first plasmin is produced from plasminogen by uPA to activate proMMP-3, and then the active MMP-3 activates proMMP-9. This pathway is involved in metastasis of cancer. In order to develop the vectors of this invention as cancer-targeting vectors, it is particularly useful to introduce a sequence cleaved by those proteases involved with metastasis of cancer as the cleavage site of the F protein. Examples of such proteases include MMP-2, MMP-9, uPA, MMP-3, and MT1-MMP, more specifically, MMP-2, MMP-9, and uPA.

10

15

20

25

30

35

When incorporating a protease cleavage sequence into the F protein, the protease cleavage sequence of interest is inserted into the cleavage site of the F protein and the originally existing trypsin-like protease cleavage site is preferably degenerated. To accomplish this purpose, the amino acid sequence around the original cleavage site for the trypsin-like protease can be substituted with the protease cleavage sequence (recognition sequence) of interest. The modified F protein is cleaved by the protease of interest when expressed in cells, and maintains the cell membrane fusion activity of the F protein. The amino acids close to the N-terminus of the Fl fragment produced by cleavage of the F protein are considered to play an important role in cell membrane fusion. Therefore, unless cleavage is inhibited, the cleavage sequence is preferably designed so that the N-terminal sequence of the F1 fragment after cleavage is identical to that of the F1 fragment of the wild-type F protein. Furthermore, to insert a linker into the cleavage site to induce efficient cleavage reaction, it is preferred that the smallest number of amino acids needed is added to the N-terminus of the cleaved F1 fragment in comparison to that of the wild-type F1. For example, five amino acids or less, preferably four amino acids or less, or more preferably three amino acids or less (for example, one, two, or three amino acids)

are added to the N-terminus after cleavage in comparison to the wild-type F1. For example, the present invention elucidated that the addition of Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: 1) added to the N-terminus of the F1 fragment of the modified F protein did not impair either the cleavage reaction by MMP or the cell membrane fusion reaction after the cleavage. Therefore, the cleavage sequence is preferably designed so that Met-Thr-Ser, or conservative substitution sequences thereof or amino acids comprising a partial sequence thereof, is added to the N-terminus of F1 after cleavage. The phrase "conservative substitution" refers to a substitution between amino acids whose amino acid side chains have similar chemical characteristics. Specifically, Met can be substituted with Ile or Val, Thr can be substituted with Ser or Ala, and Ser can be substituted with Ala, Asn, or Thr. Substitution of amino acids at each position can be performed independently.

10

15

20

25

30

35

More specific examples of the preferred cleavage sequence for MMP-2 and -9 include those comprising Pro-Leu/Gln-Gly (SEQ ID NO: 2). This sequence is a common sequence among synthetic substrates (Netzel-Arnett, S. et al., Anal. Biochem. 195, 86-92, 1991) used as substrates, and the F protein is designed so that this sequence is positioned at the C-terminus of the F2 fragment after cleavage of the modified F protein. To accomplish this, the sequence comprising the C-terminal amino acids of the F2 fragment after cleavage of the wild-type F protein is replaced with a sequence comprising Pro-Leu/Gln-Gly. The original sequence corresponding to one or several amino acids of the C-terminus of the F2 fragment of the F protein is appropriately deleted, and then, Pro-Leu/Gln-Gly is inserted (i.e., perform substitution). The number of amino acids to be deleted may be equal to the number of amino acids to be inserted (for example, three amino acids), or can be selected in the range of zero to ten amino acids or such. As long as the steps of cleavage by a protease and membrane fusion are not impaired, the F protein can be prepared so that the N-terminus of F1 is directly linked downstream of Pro-Leu/Gln-Gly. However, in the F protein of Sendai virus or such, the cleavage sequence and the F1 fragment are preferably linked via an appropriate spacer. Particularly preferred examples of such spacer-comprising cleavage sequences include those sequences comprising Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser (SEQ ID NO: Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (SEQ ID NO: 4). Met, Thr, and Ser can be conservatively substituted with other amino acids. More preferred examples of proteins include modified F proteins in which one to ten residues, such as one, two, three, four, five, or six residues, sequentially linked from the C-terminal amino acid in F2 after cleavage towards the N-terminus, are replaced with a sequence comprising Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser orPro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr. example, in the case of the Sendai virus F protein, an F protein in which the sequence (although it depends on the strain, it is typically ¹¹³Pro-Gln-Ser-Arg¹¹⁶ ↓) corresponding to the four C-terminal amino acids of the F2 fragment in the wild-type F protein (SEQ ID NO: 5) is replaced with Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser and such.

10

15

30

35

Any other desired sequence described in the present invention may be used as the cleavage sequence of MMP. In the interest of substrate specificity of the various MMPs, analyses have been performed using peptide libraries (Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19, 661-667, 2001). Detailed analyses have been performed for MMP-2 (Chen, E.I. et al., J. Biol. Chem. 277(6), 4485-4491, 2002) and MMP-9 (Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. 276(8), 20572-20578, 2001) of interest. Regarding MMP-9 in particular, the consensus sequence from P3 to P2' (P3-P2-P1-P1'-P2'; cleavage takes place between P1-P1') is proposed as Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (X= any residues; Hy= hydrophobic residue). This consensus sequence also matches one of those proposed for MMP-2 (Pro-X-X-Hy), and thus, is considered to be a good design to accomplish specificity for MMP-2 and MMP-9. Therefore, from such well, the sequences shown -(Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser or Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr) have been supported as preferable examples. Specifically, the sequence of the F protein cleavage site preferably comprises Pro-X-X-Hy-Thr/Ser, and more preferably Pro-X-X-Hy-Thr/Ser-Thr/Ser ("Thr/Ser" means either Thr For example, Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala Pro-Gln-Gly-Leu-Tyr-Ala that do not match with Pro-X-X-Hy-Thr/Ser are not preferred (Fig. 44). By inserting into the F protein cleavage site a peptide that matches with the Pro-X-X-Hy-Thr/Ser sequence,

a vector showing high infiltration ability in the presence of MMP can be constructed.

Other examples of preferable cleavage sequences include those cleaved by a plasminogen activator. Specific examples of cleavage sequences of uPA and tPA include sequences comprising Val-Gly-Arg. The F protein is designed so that this sequence is positioned at the C-terminus of the F2 fragment of the modified F protein after cleavage. To accomplish this, the sequence comprising C-terminal amino acids of the F2 fragment after cleaving the wild-type F protein can be replaced with a sequence comprising Val-Gly-Arg (SEQ ID NO: 6). More preferable examples of preferred proteins include a modified F protein in which one to ten residues, for example, one, two, three, four, five, or six residues, sequentially positioned from the C-terminal amino acid of F2 after cleavage towards the N-terminus are replaced with Val-Gly-Arg or a sequence comprising this sequence. For instance, in the Sendai viral F protein, examples include the F protein whose sequence corresponding to the three C-terminal amino acids of the F2 fragment in the wild-type F protein (typically 114Gln-Ser-Arg116 (SEQ ID NO: 7), although it depends on the strain) is substituted with Val-Gly-Arg.

.10

20

25

30

35

To efficiently identify a modified F protein that exerts fusogenicity in the presence of a specific protease, an assay system using a plasmid vector can be utilized (Example 31). Specifically, a plasmid vector expressing the modified F protein is transfected to cells, and the resulting cell is cultured in the presence of a protease to detect syncytium formation. The modified F protein encoded by the plasmid that causes syncytium formation is cleaved by protease to determine if it shows fusogenicity. For example, to assay the F protein that is cleaved by MMP, HT1080 cells that express MMP may be used. Alternatively, MMP may be added to the culture system. Using the assay system developed in this invention, a modified F protein having fusogenicity can be readily obtained.

A vector encoding a modified F protein can introduce the genomic RNA contained in the vector into cells contacting the cells transfected with the vector, depending on the presence of a protease that cleaves the modified F protein. The action of the cleaved F protein causes

cell fusion between cells in contact, and the RNP spreads to the fused cells. That is, the vector of the present invention does not form viral particles; however, it can transfer the vector to a localized region due to the infiltration of vectors into contacting cells such as described above. The protease may be expressed intracellularly or extracellularly, or may be added exogenously.

5

10

15

20

25

30

The modified F proteins provided by the present invention show cell fusogenicity depending on a specific protease. By utilizing this protein, viral vectors, drugs and gene delivery vectors, such as liposomes, that causes cell fusion or specific infection only in the presence of the protease can be constructed. For example, by equipping the F gene of an adenoviral vector comprising F and HN genes (Galanis, E. et al., Hum. Gene Ther. 12, 811-821, 2001) with the gene of the modified F protein which is cleaved by a protease specifically expressed in cancer cells, vectors that cause cell fusion in the presence of the specific protease can be developed. In addition, for example, when pseudotyping a retrovirus with F and HN proteins (Spiegel, M. et al., J Virol. 72(6), 5296-5302, 1998), a cancer cell-targeting vector that specifically infects cancers may be developed using the modified F protein during construction process, which protein is cleaved by a protease expressed in cancers. As described above, in addition to the vectors of this invention, the modified F proteins provided by the present invention and nucleic acids encoding them may be utilized to develop various vectors that depend on proteases.

Furthermore, the present invention provides paramyxoviral vectors comprising a modified F protein in which the cell fusogenicity is increased by deletion of the cytoplasmic domain. A portion of the amino acids of the cytoplasmic domain is deleted such that 0 to 28, preferably 1 to 27, and more preferably 4 to 27 amino acids exist in the cytoplasmic domain of this modified F protein. The phrase "cytoplasmic domain" refers to the cytoplasmic side of the membrane protein, and in the F protein, it corresponds to the C-terminal region of the transmembrane (TM) region (see Fig. 42). For example, the F protein comprising 6 to 20, preferably 10 to 16, and more preferably 13 to 15 amino acids as the cytoplasmic domain shows significantly high levels of cell fusogenicity as compared to the wild-type F protein.

Therefore, preparation of a paramyxoviral vector that comprises an F protein modified such that its cytoplasmic domain comprises approximately 14 amino acids enables the acquisition of vectors having higher cell fusogenicity as compared to those obtained with a wild-type F protein. Preferably, this deletion F protein lacks 10 or more, preferably 15 or more, more preferably 20 or more, still more preferably 25 or more, and furthermore preferably 28 or more of the C-terminal amino acids of the wild-type F protein. According to the most preferred aspect, the cytoplasmic domain-deleted F protein lacks approximately 28 amino acids from the C-terminus of the wild-type F protein. The paramyxoviral vectors which comprise genes encoding these cytoplasmic domain-deleted F proteins on the genome have higher cell fusogenicity as compared to conventional vectors, and thus, more strongly infiltrate into the surrounding cells. Modification of the cleavage site of this F protein as described herein yields a vector that exhibits a high infiltration ability only in the presence of a specific protease.

.10

15

20

25

30

35

The present invention further relates to a fusion protein consisting of two kinds of spike proteins carried by the paramyxovirus. The paramamyxovirus has a protein considered to function in cell fusion (called the "F" protein) and a protein considered to function in adhesion to cells (called the "HN" or "H" protein). Herein, the former is generally called the F protein, and the latter the HN protein. These two proteins expressed as a fusion protein exert extremely strong fusogenicity as compared to separate expression of the proteins. 'In this fusion protein, the proteins are bonded through a portion of their cytoplasmic domains. Specifically, the fusion protein comprises the F protein at its N-terminus and the HN (or H) protein at its C-terminus. When fusing these proteins, the whole proteins may be fused to each other, or alternatively, the F protein which lacks a portion or the whole cytoplasmic domain may be fused to the HN (or H) protein. In the latter case, the number of amino acid residues from downstream of the TM region of the F protein to the HN (or H) protein is five or more, preferably ten or more, more preferably 14 or more, and still more preferably 20 or more. For example, when fusing an F protein that lacks the cytoplasmic domain to the HN (or H) protein, it is preferable to adjust the length by adding a linker peptide of appropriate length to the C-terminus of the F protein portion. Specifically, a cytoplasmic domain-deleted F protein comprising 14 residues of cytoplasmic domain fused to the HN (or H) protein via any linker peptide is preferably used. The linker peptide may be, for example, approximately 50 residues. The amino acid sequence of the linker peptide is not particularly limited; however, it is preferable to adopt a polypeptide which does not have significant physiological activity, and suitable examples include the polypeptide shown in Fig. 43 (SEQ ID NO: 80).

10.

15

20

25

30

35

The present invention further relates to nucleic acids encoding these fusion proteins, and expression vectors comprising these nucleic acids. Cells transfected with these expression vectors show strong fusogenicity, and form syncytia through fusion with the surrounding cells. Expression vectors are not particularly limited, and include, for example, plasmid vectors and viral vectors. In the case of a DNA vector, use in combination with a strong promoter such as the CAG promoter (a chimeric promoter comprising chicken β -actin promoter and CMV enhander) (Niwa, H. et al., Gene 108, 193-199, 1991) is preferred. A viral vector expressing a protein of the present invention yields strong fusion in transfected cells. Examples of suitable viral vectors include retroviral vectors, lentiviral vectors, adenoviral vectors, adeno-associated viral vectors, minus strand RNA viral vectors, simple herpes viral vectors, retroviral vectors, lentiviral vectors, Semliki forest viral vectors, sindbis viral vectors, vaccinia viral vectors, fowlpox viral vectors, and other preferable viral vectors. The paramyxovirus vectors that express the present protein(s) exhibit high infiltration ability towards various tissues. In particular, the use of an M gene-deleted paramyxoviral vector encoding a fusion protein of the present invention with a modified F protein cleavage site leads to the production of a vector that induces strong cell fusion in specific tissues.

These recombinant viral vectors can be prepared according to methods well known to those skilled in the art. For example, an adenoviral vector that is most commonly used for gene therapy and such can be constructed by the method of Saito et al. and other methods (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320-24, 1996; Kanegae

et al., Acta Paediatr. Jpn., 38, 182-188, 1996; Kanegae et al., "Baiomanyuaru shiriizu 4-Idenshi-donyu to' Hatsugen□Kaisekiho (Biomanual Series 4: Methods for gene transfection, expression, and analysis)", Yodosha, 43-58, 1994; Kanegae et al., Cell Engineering, 13(8), 757-763, 1994). In addition, for example, retroviral vectors (Wakimoto et al., Protein Nucleic acid and Enzyme (Japanese) 40, 2508-2513, 1995), adeno-associated viral vectors (Tamaki et al., Protein Nucleic acid and Enzyme (Japanese) 40, 2532-2538, 1995) and such can be prepared by conventional methods. As specific methods for producing other viral vectors capable of transferring genes to mammals, methods for producing recombinant vaccinia virus are known and described in Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-502069, Examined Published Japanese Patent Application No. (JP-B) Hei 6-95937, and JP-B Hei 6-71429. Known methods for producing recombinant papilloma viruses include those described in JP-B Hei 6-34727, and Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-505626. Furthermore, known methods for producing recombinant adeno-associated viruses and recombinant adenoviruses include those described in Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) Hei 5-308975 And Published Japanese Translation of International Publication No. Hei 6-508039, respectively.

10

20

25

30

35

In the RNA genome, which is comprised in the vector provided as an aspect of this invention, the gene encoding the matrix (M) protein (i.e., the M gene) is mutated or deleted. According to the present invention, the cleavage site of the F protein is modified to a sequence that is cleaved by another protease, and furthermore, the M gene is mutated or deleted to suppress particle forming ability. Thereby, a vector with a completely new property that does not release viral particles, and infiltrates into only a group of cells expressing a particular protease has been successfully developed. The mutation of the M gene eliminates or significantly lowers the particle forming activity in the intrahost environment. Such mutations in cells that express this M protein can be identified by detecting a decrease in the cell surface aggregation of this protein (see Examples).

According to the present invention, the most effective

modification for suppressing secondary release of particles, i.e., release of VLP, was confirmed to be the deletion of the M protein. This fact is also supported by studies reporting on the role of the M proteins in virion formation in Sendai virus (SeV) and other minus (-) strand RNA viruses. For example, it has been found that strong expression of the M protein in vesicular stomatitis virus (VSV) causes the budding of VLPs (Justice, P.A. et al., J. Virol. 69, 3156-3160, 1995); likewise, parainfluenza virus VLP formation is also reported to occur on mere overexpression of M protein (Coronel, E.C. et al., J. Virol. 73, 7035-7038, 1999). While this kind of VLP formation, caused by M protein alone, is not observed in all (-) strand RNA viruses, M proteins are recognized to serve as virion formation cores in (-) strand RNA viruses (Garoff, H. et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1171-1190, 1998).

10

15

20

25

35

The specific role of the M protein in virion formation is summarized as follows: Virions are formed in so-called lipid rafts on the cell membrane (Simons, K. and Ikonen, E., Nature 387, 569-572, 1997). These were originally identified as lipid fractions that were insoluble with non-ionic detergents, such as Triton X-100 (Brown, D.A. and Rose, J.K., Cell 68, 533-544, 1992). Virion formation in lipid rafts has been demonstrated for the influenza virus (Ali, A. et al., J. Virol. 74, 8709-8719, 2000), measles virus (MeV; Manie, S.N. et al., J. Virol. 74, 305-311, 2000), SeV (Ali, A. and Nayak, D.P., Virology 276, 289-303, 2000), and others. At these lipid raft sites, the Mprotein enhances virion formation, concentrating envelope proteins (also referred to as spike proteins) and ribonucleoprotein (RNP). In other words, the M protein may function as a driving force for virus assembly and budding (Cathomen, T. et al., EMBO J. 17, 3899-3908, 1998; Mebatsion, T. et al., J. Virol. 73, 242-250, 1999). 30 In fact, the M protein has been revealed to bind to the cytoplasmic tail of influenza virus spike proteins and such (Zhang, J. et al., J. Virol. 74, 4634-4644, 2000), SeV (Sanderson, C.M. et al., J. Virol. 67, 651-663, 1993). It also binds with the RNP of the influenza virus (Ruigrok, R.W. et al., Virology 173, 311-316, 1989), parainfluenza virus, SeV (Coronel, E.C. et al., J. Virol. 75, 1117-1123, 2001), etc. Further, in the case of SeV (Heggeness, M.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6232-6236, 1982) and vesicular stomatitis virus, etc (VSV; Gaudin, Y. et al., Virology 206, 28-37, 1995; Gaudin, Y. et al., J. Mol. Biol. 274, 816-825, 1997), Mproteins have been reported to form oligomers with themselves. Thus, due to the capacity of the M protein to function in association with many virus components and lipids, the protein is considered to function as the driving force for virus assembly and budding.

10

15

20

25

30

35

In addition, some reports suggest that envelope protein (spike protein) modification may also suppress VLP release. The following experimental examples are specific reports in which virion formation was actually suppressed: a G protein deficiency in rabies virus (RV) resulted in a 1/30 reduction of VLP formation (Mebatsion, T. et al., Cell 84, 941-951, 1996). When the M protein was deficient, this level dropped to 1/500,000 or less (Mebatsion, T. et al., J. Virol. 73, 242-250, 1999). Further, in the case of the measles virus (MeV), cell-to-cell fusion was enhanced when the M protein was deficient (Cathomen, T. et al., EMBO J. 17, 3899-3908, 1998). This is presumed to result from the suppression of virion formation (Li, Z. et al., J. Virol. 72, 3789-3795, 1998). In addition, similar fusion enhancement arose with mutations in the cytoplasmic tail of F or H protein (the tail on the cytoplasmic side) (Cathomen, T. et al., J. Virol. 72, 1224-1234, 1998). Therefore, introducing a mutation which causes the deletion of only the cytoplasmic tail of the F and/or HN proteins may suppress particle formation. However, since many VLPs have been reported to exist in the F-deficient form (WO 00/70070) or the HN-deficient form (Stricker, R. and Roux, L., J. Gen. Virol. 72, 1703-1707, 1991), particularly in SeV, the effect of modifying these spike proteins may be limited. Furthermore, the following has also been clarified with regards to SeV: When the SeV proteins F and HN are on secretory pathways (specifically, when they are located in Golgi bodies, etc.), the cytoplasmic tails (of the F and HN proteins) bind with the M protein (Sanderson, C.M. et al., J. Virol. 67, 651-663, 1993; Sanderson, C.M. et al., J. Virol. 68, 69-76, 1994). Thus, it is presumed that this binding is important for the efficient transfer of the M protein to cell membrane lipid rafts, where virions are formed. The M protein was thought to bind to the F and HN proteins in the cytoplasm, and as a result to be transferred to the cell membrane via F and HN protein secretory pathways. As described above, the M protein plays an essential role in viral particle formation. The use of a modified M protein gene that eliminates M protein aggregation on the cell surface enables production of vectors without particle forming ability.

10

15

20

25

30

The subcellular localization of the M protein can be determined by cell fractionation, or by directly detecting M protein localization using immunostaining, or such. In immunostaining, for example, M protein stained by a fluorescently labeled antibody can be observed under a confocal laser microscope. Alternatively, after the cells have been lysed, a cell fraction can be prepared using a known cell fractionation method, and localization can then be determined by identifying the M protein-containing fraction using a method such as immunoprecipitation or Western blotting using an antibody against the M protein. Virions are formed in so-called cell membrane lipid rafts, lipid fractions that are insoluble with non-ionic detergents such as Triton X-100. The M protein is believed to participate in the aggregation of viral components in the lipid rafts due to its ability to bind to spike proteins, RNP, and to M protein itself, and further to lipids. Accordingly, the M protein, detected by electrophoresis or such with the lipid raft fraction, is presumed to reflect aggregated M protein. Namely, when the amount of detectable M protein is reduced, cell-surface M protein aggregation is determined to be reduced. M protein aggregation on cell membranes can be directly observed using the immunocytological staining methods used by the present inventors for detecting subcellular localization. utilizes an anti-Mantibody available for immunocytological staining. On investigation using this method, an intensely condensed image is observed near the cell membrane when the M protein is aggregated. When the M protein is not aggregated, there is neither a detectable condensation pattern nor a clear outline of the cell membrane. In addition, only a slight stain is observed in the cytoplasm. Thus, when little or no condensation pattern is detected, the cell membrane outline is indistinct, and slight staining is observed throughout the cytoplasm, cell-surface M protein aggregation is judged to be

reduced.

10

15

20

25

30

35

Mutant M proteins having significantly reduced cell-surface aggregation activity are judged to have significantly lower particle formation ability as compared to that of wild-type M proteins'. 'The reduction of particle formation ability in the virus is statistically significant (for example, at a significant level of 5% or less). Statistical verification can be carried out using, for example, the Student't-test or the Mann-Whitney U-test. Particle formation ability of the virus vectors, comprising mutant M gene, in intrahost environment is reduced to a level of preferably 1/5 or less, more preferably 1/10 or less, more preferably 1/30 or less, more preferably 1/50 or less, more preferably 1/100 or less, more preferably 1/300 or less, and more preferably 1/500 or less. Most preferably, the vectors of this invention substantially lack viral particle-producing ability in the intrahost environment. The phrase "substantially lack" means that no viral particle production is detected in the intrahost environment. In such cases, there exist 103 or less, preferably 102 or less, and more preferably 10¹ or less per ml of the viral particles.

The presence of viral particles can be directly confirmed by observation under an electron microscope, etc. Alternatively, they can be detected and quantified using viral nucleic acids or proteins as indicators. For example, genomic nucleic acids in the viral particles may be detected and quantified using general methods of nucleic acid detection such as the polymerase chain reaction (PCR). Alternatively, viral particles comprising a foreign gene can be quantified by infecting them into cells and detecting expression of that gene. Non-infective viral particles can be quantified by detecting gene expression after introducing the particles into cells in combination with a transfection reagent. The viral particles of the present invention comprise particles without infectivity, such as VLP.

Furthermore, potency of the virus can be determined, for example, by measuring Cell-Infected Units (CIU) or hemagglutination activity (HA) (WO 00/70070; Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996; Yonemitsu, Y. and Kaneda, Y., "Hemaggulutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular cells.", Ed. by

Baker, A. H., Molecular Biology of Vascular Diseases. Methods in Molecular Medicine., Humana Press., 295-306, 1999). In the case of vectors labeled with marker genes, such as the GFP gene, virus titer is quantified by directly counting infected cells using the marker as an indicator (e.g., as GFP-CIU) as described in the Examples. Titers thus determined can be considered equivalent to CIU (WO 00/70070). For example, the loss of viral particle production ability can be confirmed by the lack of detectable infectivity titer when cells are transfected with a sample which may comprise viral particles. Detection of viral particles (VLP and such) without infectivity can performed by transfection using a lipofection reagent. Specifically, for example, DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland; Cat. No. 1811169) can be used. One hundred microliters of a solution with or without viral particles is mixed with 12.5 µl DOSPER, and allowed to stand for ten minutes at room temperature. The mixture is shaken every 15 minutes and transfected to cells confluently cultured on 6-well plates. VLPs can be detected by the presence or absence of infected cells from the second day after transfection.

10

20

25

30

The phrase "intrahost environment" refers to an environment within the host wherein the wild-type paramyxovirus, from which the vector of interest is derived, normally proliferates in nature, or an environment that allows equivalent virus proliferation. The intrahost environment may be, for example, the optimum growth condition for the virus. When the host of the paramyxovirus is a mammal, the intrahost environment refers to the *in vivo* environment of a mammal, or equivalent environment thereof. Namely, the temperature is approximately 37°C to 38°C (for example, 37°C) corresponding to that in the body of the mammal. An example of an *in vitro* condition includes a normal cell culture condition, more specifically a moist culture environment in a media with or without serum (pH 6.5 to 7.5), at 37°C, under 5% CO₂.

Important differences in the activity of a modified M protein due to environmental conditions include conditional mutations of the M protein, such as temperature sensitive mutations. The phrase "conditional mutation" refers to a mutation which shows a mutated

phenotype of "loss of function" in the intrahost environment, while exhibiting functional activity in another environment. For example, a gene encoding a temperature-sensitive mutated M protein; whose function is mostly or completely lost at 37°C but is recovered at a lower temperature, can be preferably used. "temperature-sensitive mutation" refers to a mutation wherein the activity is significantly decreased at high temperature (for example, 37°C) as compared to that at low temperature (for example, 32°C). The present inventors successfully produced a viral particle whose particle forming ability is dramatically decreased at 37°C, a temperature corresponding to the intrahost environment, using the temperature-sensitive mutant of the M protein. This M protein mutant aggregates at the cell surface under low temperature conditions (for example, 32°C) to form viral particles; however, at the normal body temperature (37°C) of a host, it loses aggregability and fails to form viral particles. A vector comprising nucleic acids encoding such a temperature-sensitive M protein mutant on its genome is preferred as the vector of this invention. The M protein of such a viral vector encodes a conditionally mutated M protein that functions under M protein functioning conditions, i.e., permissive conditions, to form viral particles. When viral particles produced in this manner are infected under normal environment, the M protein cannot function and, thus, no particles are formed.

10

20

25

30

The temperature-sensitive M gene mutation is not particularly limited, however, and includes, for example, at least one of the amino acid sites selected from the group consisting of G69, T116, and A118 from the Sendai virus M protein, preferably two sites arbitrarily selected from among these, and more preferably all three sites. Other (-)strand RNA virus M proteins comprising homologous mutations can also be used as appropriate. Herein, G69 means the 69th amino acid glycine in M protein, T116 the 116th amino acid threonine in M protein, and A183 the 183rd amino acid alanine in M protein.

The gene encoding the M protein (i.e., the M gene) is widely conserved in (-)strand RNA viruses, and is known to interact with both the viral nucleocapsid and the envelope proteins (Garoff, H. et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 117-190, 1998). The SeV M protein

amino acid sequence 104 to 119 (104-KACTDLRITVRRTVRA-119 / SEQ ID NO: 45) is presumed to form an amphiphilic α-helix, and has been identified as an important region for viral particle formation (Mottet, G. et al., J. Gen. Virol. 80, 2977-2986, 1999). This region is widely conserved among (-)strand RNA viruses. M protein amino acid sequences are similar among (-)strand RNA viruses. In particular, known M proteins in viruses belonging to the subfamily Paramyxovirus are commonly proteins with 330 to 380 amino acid residues. Their structure is similar over the whole region, though the C-end halves have particularly high homology (Gould, A. R., Virus Res. 43, 17-31, 1996; Harcourt, B. H. et al., Virology 271, 334-349, 2000). Therefore, for example, amino acid residues homologous to G69, T116 and A183 of the SeV M protein can be easily identified.

10

15

20

25

35

Amino acid residues at sites homologous to other (-)strand RNA virus M proteins corresponding to G69, T116 and A183 of the SeV M proteins can be identified by one skilled in the art through alignment with the SeV M protein, using an amino acid sequence homology search program which includes an alignment forming function, such as BLAST, or an alignment forming program, such as CLUSTAL W. Examples of homologous sites in M proteins that correspond to G69 in the SeV M protein include G69 in human parainfluenza virus-1 (HPIV-1); G73 in human parainfluenza virus-3 (HPIV-3); G70 in phocine distemper virus (PDV) and canine distemper virus (CDV); G71 in dolphin molbillivirus (DMV); G70 in peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV) and rinderpest virus (RPV); G81 in Hendra virus (Hendra) and Nipah virus (Nipah); G70 in human parainfluenza virus-2 (HPIV-2); E47 in human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a) and human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b); and E72 in mumps virus (Mumps). (Descriptions in brackets indicate the abbreviation; letters and numbers indicate amino acids and positions.) Examples of homologous sites of M proteins corresponding to T116 in the SeV M protein include T116 in human parainfluenza virus-1 (HPIV-1); T120 in human parainfluenza virus-3 (HPIV-3); T104 in phocine distemper virus (PDV) and canine distemper T105 in dolphin molbillivirus (DMV); peste-des-petits-ruminants virus (PDPR), measles virus rinderpest virus (RPV); T120 in Hendra virus (Hendra) and Nipah virus

(Nipah); T117 in human parainfluenza virus-2 (HPIV-2) and simian parainfluenza virus 5 (SV5); T121 in human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a) and human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b); T119 in mumps virus (Mumps); and S120 in Newcastle disease virus (NDV). Examples of homologous sites of M proteins corresponding to A183 of SeV M protein are A183 in human parainfluenza virus-1 '(HPIV-1); F187 in human parainfluenza virus-3 (HPIV-3); Y171 in phocine distemper virus (PDV) and canine distemper virus (CDV); Y172 in dolphin molbillivirus (DMV); Y171 in peste-des-petits-ruminants virus (PDPR); measles virus (MV) and rinderpest virus (RPV); Y187 in Hendra virus (Hendra) and Nipah virus (Nipah); Y184 in human parainfluenza virus-2 (HPIV-2); F184 in simian parainfluenza virus 5 (SV5); F188 in human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a) and human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b); F186 in mumps virus (Mumps); and Y187 in Newcastle disease virus (NDV). Among the viruses mentioned above, viruses suitable for use in the present invention include those comprising genomes which encode an M protein mutant, where amino acid residue(s) have been substituted at any one of the above-mentioned three sites, preferably at an arbitrary two of these three sites, and more preferably at all three sites.

10

15

20

25

30

35

An amino acid mutation includes substitution with any other desirable amino acid. However, the substitution is preferably with an amino acid having different chemical characteristics in its side chain. Amino acids can be divided into groups such as basic amino acids (e. g., lysine, arginine, histidine); acidic amino acids (e. g., aspartic acid, glutamic acid); uncharged polar amino acids (e. g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine); nonpolar amino acids (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophane); β -branched amino acids (e.g., threonine, valine, isoleucine); and aromatic amino acids (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophane, histidine). One amino acid residue, belonging to a particular group of amino acids, may be substituted for by another amino acid, which belongs to a different group. Specific examples include but are not limited to: substitution of a basic amino acid for an acidic or neutral amino acid; substitution of a polar amino acid for a nonpolar amino

acid; substitution of an amino acid of molecular weight greater than the average molecular weights of 20 naturally-occurring amino acids, for an amino acid of molecular weight less than this average; and conversely, substitution of an amino acid of molecular weight less than this average, for an amino acid of molecular weight greater than this average. For example, Sendai virus M proteins comprising mutations selected from the group consisting of G69E, T116A, and A183S or other paramyxovirus M proteins comprising mutations at homologous positions thereto can be suitably used. Herein, G69E refers to a mutation wherein the 69th M protein amino acid glycine is substituted by glutamic acid, T116A refers to a mutation wherein the 116th M protein amino acid threonine is substituted by alanine, and A183S refers to a mutation wherein the 183rd M protein amino acid alanine is substituted by serine. In other words, G69, T116 and A183 in the Sendai virus M protein or homologous M protein sites in other viruses, can be substituted by glutamic acid (E), alanine (A), and serine (S), respectively. These mutations are preferably utilized in combination, and it is particularly preferable to include all three of the above-mentioned mutations. M gene mutagenesis can be carried out according to a known mutagenizing method. For example, as described in the Examples, a mutation can be introduced by using oligonucleotide containing a desired mutation.

10

15

25

35

In the case of measles virus for example, the M gene sequence of temperature-sensitive strain P253-505, in which the epitope sequence of an anti-M protein monoclonal antibody has been altered, can be used (Morikawa, Y. et al., Kitasato Arch. Exp. Med. 64, 15-30, 1991). In addition, the threonine at residue 104 of the measles virus M protein, or the threonine at residue 119 of the mumps virus M protein, which correspond to the threonine at residue 116 of the SeV M protein, may be substituted with any other amino acid (for example, alanine).

According to a more preferred embodiment, the vectors of the present invention comprise M gene deficiencies. The phrase "M gene deficiency" refers to a lack of the function of M protein, including cases where the vector has an M gene comprising a functionally deficient mutation, and cases where the M gene is absent from the vector. A functionally deficient M gene mutation can be produced, for example,

by deleting the M gene protein-encoding sequence, or by inserting another sequence. For example, a termination codon can be inserted partway through the M protein-encoding sequence (WO 00/09700). Most preferably, the vectors of the present invention are completely devoid of M protein-encoding sequences. Unlike a vector encoding a conditional mutant M protein, a vector without an M protein open reading frame (ORF) cannot produce viral particles under any conditions.

.10

20

25

30

35

In order to produce the vectors of the present invention, cDNAs encoding the paramyxovirus' genomic RNA are transcribed, in the presence of viral proteins necessary for the reconstitution of RNPs which comprise the paramyxovirus' genomic RNA, i.e., in the presence of N, P, and L proteins. The viral RNP may be reconstituted by forming a negative strand genome (i.e., the antisense strand that is the same as the viral genome) or a positive strand (the sense strand encoding the viral proteins). For improved reconstitution efficiency, formation of the positive strand is preferable. The 3'-leader and 5'-trailer sequence at the RNA ends preferably reflects the natural viral genome as accurately as possible. To accurately control the 5'-end of the transcription product, a T7 RNA polymerase recognition sequence may be used as a transcription initiation site to express the RNA polymerase in cells. The 3'-end of the transcription product can be controlled, for example, by encoding a self-cleaving ribozyme onto this 3'-end, ensuring it is accurately cut (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78, 2813-2820, 1997; Kato, A. et al., EMBO J. 16, 578-587, 1997; Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466, 1997).

A cloning site for inserting foreign genes into cDNA that encodes the genomic RNA can be designed in order to facilitate insertion of a foreign gene. The site may be inserted at any preferred position of the protein non-coding region on the genome. Specifically, the site may be inserted between the 3'-leader region and the viral protein ORF closest to the 3'-terminus, between viral protein ORFs, and/or between the viral protein ORF closest to the 5'-terminus and the 5'-trailer region. In an M gene-deficient genome, the cloning site can be designed at the deleted site of the M gene. The cloning site may be, for example, a recognition sequence for a restriction enzyme. The cloning site may be the so-called multi-cloning site comprising

a plurality of restriction enzyme recognition sequences. The cloning site can be divided to exist at multiple sites on the genome so that a plurality of foreign genes can be inserted into different positions of the genome.

Recombinant virus RNP lacking particle formation ability can be constructed according to, for example, the descriptions in "Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78, 2813-2820, 1997", "Kato, A. et al., EMBO J. 16, 578-587, 1997" and "Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466, 1997". This method is outlined below:

10

15

2.0

25

30

35

To introduce a foreign gene, a DNA sample comprising the cDNA nucleotide sequence of the desired foreign gene is first prepared. The DNA sample is preferably electrophoretically identified as a single plasmid at a concentration of 25 ng/µl or more. The following example describes the use of the NotI site in the insertion of a foreign gene into DNA encoding viral genomic RNA: If the target cDNA nucleotide sequence comprises a NotI recognition site, this site should be removed beforehand using a technique such as site-specific mutagenesis to change the nucleotide sequence, without changing the amino acid sequence it codes. The desired gene fragment is amplified and recovered from this DNA sample using PCR. By attaching NotI sites to the 5'-regions of the two primers, both ends of the amplified fragment become NotI sites. The E-I-S sequence or a part thereof is included in the primer, so that the E-I-S sequence is placed between both the ORFs on either side of the viral genes, and the ORF of the foreign gene (after it has been incorporated into the viral genome).

For example, to assure cleavage by NotI, the forward side synthetic DNA sequence is arranged as follows: Two or more nucleotides (preferably four nucleotides, excluding sequences such as GCG and GCC that are derived from the NotI recognition site; more preferably ACTT) are randomly selected on its 5'-side, and a NotI recognition site "gcggccgc" is added to its 3'-side. In addition, a spacer sequence (nine random nucleotides, or nucleotides of nine plus a multiple of six) and an ORF (a sequence equivalent to about 25 nucleotides and comprising the initiation codon ATG of the desired cDNA) are also added to the 3'-side. About 25 nucleotides are preferably selected from the desired cDNA, such that G or C is the final nucleotides on

the 3'-end of the forward side synthetic oligo DNA.

20

25

30

35

The reverse side synthetic DNA sequence is arranged as follows: Two or more random nucleotides (preferably four nucleotides, excluding sequences such as GCG and GCC that originate in the NotI recognition site; more preferably ACTT) are selected from the 5'-side, a NotI recognition site "gcggccgc" is added to the 3'-side, and an oligo DNA insertion fragment is further added to the 3'-side in order to regulate length. The length of this oligo DNA is designed such that the number of nucleotides in the final PCR-amplified NotI fragment product, which comprises the E-I-S sequence, becomes a multiple of six (the so-called "rule of six"; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72, 891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67, 4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67, 4822-4830, 1993). A sequence complementary to the Sendai virus S sequence, preferably 5'-CTTTCACCCT-3' (SEQ ID NO: 8), a sequence complementary to the I sequence, preferably 5'-AAG-3', and a sequence complementary to the E sequence, preferably 5'-TTTTTCTTACTACGG-3' (SEQ ID NO: 9), are further added to the 3'-side of the inserted oligo-DNA fragment. When these primers to which E-I-S sequence is added are used, the 3'-end of the reverse side synthetic DNA is formed by the addition of a complementary sequence, equivalent to about 25 nucleotides counted in reverse from the termination codon of the desired cDNA, and whose length is selected such that G or C becomes the final nucleotide.

PCR can be carried out according to a usual method with Taq polymerase or such. Desired fragments thus amplified are digested with NotI, and then inserted into the NotI site of the plasmid vector pBluescript. The nucleotide sequences of the PCR products thus obtained are confirmed using a sequencer to select a plasmid comprising the correct sequence. The inserted fragment is excised from the plasmid using NotI, and cloned to the NotI site of the plasmid carrying the genomic cDNA. Alternatively, recombinant Sendai virus cDNA can be obtained by directly inserting the fragment into the NotI site, without the mediation of the plasmid vector.

For example, a recombinant Sendai virus genome cDNA can be constructed according to the method described in the references (Yu, D. et al., Genes Cells 2, 457-466, 1997; Hasan, M. K. et al., J. Gen.

Virol. 78, 2813-2820, 1997). For example, an 18-bp spacer sequence comprising a NotI restriction site (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (SEQ ID NO: 10) is inserted into a cloned Sendai virus genome cDNA (pSeV(+)) between the leader sequence and the ORF of N protein, and thus a plasmid pSeV18*b(+) containing a self-cleaving ribozyme site derived from the antigenomic strand of delta-hepatitis virus is obtained (Hasan, M. K. et al., J. General Virology 78, 2813-2820, 1997).

10

15

25

30

35

In addition, for example, in the case of M gene deletion, or introduction of a temperature-sensitive mutation, the cDNA encoding genomic RNA is digested by a restriction enzyme, and the ${\tt M}$ gene-comprising fragments are collected and cloned into an appropriate plasmid. M gene mutagenesis or construction of an M gene-deficient site is carried out using such a plasmid. The introduction of a mutation can be carried out, for example, using a QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the method described in the kit directions. For example, M gene deficiency or deletion can be carried out using a combined PCR-ligation method, whereby deletion of all or part of the M gene ORF, and ligation with an appropriate spacer sequence, can be achieved. After obtaining an M gene-mutated or -deficient sequence, fragments comprising the sequence are recovered, and the M gene region in the original full-length cDNA is substituted by this sequence. Thus, a viral genome cDNA comprising a mutated M gene, can be prepared. Using similar methods, mutation can be introduced into, for example, F and/or HN genes.

The vectors of this invention can be reconstituted by intracellularly transcribing DNAs encoding the genomic RNAs in the presence of the viral protein. The present invention provides DNAs encoding the viral genomic RNAs of the vectors of this invention, which are used to produce the vectors of this invention. Furthermore, the present invention relates to the use of DNAs encoding the genomic RNAs of the vectors for producing the vectors of this invention. Viral reconstitution from (-)strand virus' genomic cDNAs can be carried out using known methods (WO 97/16539; WO 97/16538; Durbin, A. P. et al., Virology 235, 323-332, 1997; Whelan, S. P. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 92, 8388-8392, 1995; Schnell. M. J. et al., EMBO J. 13, 4195-4203, 1994; Radecke, F. et al., EMBO J. 14, 5773-5784, 1995; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4477-4481, 1995; Garcin, D. et al., EMBO J. 14, 6087-6094, 1995; Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996; Baron, M. D. and Barrett, T., J. Virol. 71, 1265-1271, 1997; Bridgen, A. and Elliott, R. M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 15400-15404, 1996). Using these methods, (-) strand RNA viruses, or RNP as viral components, can be reconstituted from their DNA, including viruses such as parainfluenza virus, vesicular stomatitis virus, rabies virus, measles virus, rinderpest virus, Sendai virus, etc. The vectors of the present invention can be reconstituted according to these methods.

10

15.

20

25

30

35

Specifically, the vectors of the present invention can be produced by the steps of: (a) transcribing the cDNA, which encodes the paramyxoviral genomic RNA (negative strand RNA) or its complementary strand (positive strand), in cells expressing N, P, and L proteins; and (b) collecting a complex, which comprises the genomic RNA, from the cells or their culture supernatant. The transcribed genomic RNA is replicated in the presence of N, L, and P proteins to form the RNP complex. When step (a) is performed in the presence of a protease that cleaves the modified F protein encoded by the genome, the resulting RNP is transferred to cells that are in contact with the cells, infection spreads, and the vector is amplified. According to this method, the vectors of this invention can be produced in RNP form in spite of the absence of a functional M protein.

Enzymes needed for the initial transcription of the genomic RNA from DNA, such as T7 RNA polymerase, can be provided by transfecting plasmids or viral vectors that express the enzymes. Alternatively, the enzymes can be provided by incorporating their genes into the chromosome of cells to allow expression to be induced during virus reconstitution. Furthermore, viral proteins necessary for genomic RNA and vector reconstitution are provided, for example, by introducing plasmids that express these proteins. To provide these viral proteins, helper viruses such as wild-type paramyxovirus or certain kinds of mutant paramyxovirus may be used. However, since

this causes contamination by these viruses, the use of helper viruses is not preferred.

Methods for transferring DNAs which express genomic RNAs into cells include, for example, the following: 1) the method for preparing DNA precipitates that can be taken up by objective cells; 2) the method for preparing a positively charged DNA-comprising a complex which has low cytotoxicity and can be taken up by target cells; and 3) the method for using electric pulses to instantaneously open holes in target cell membranes so that DNA molecules can pass through.

10

15

25

30

35

In the above method 2), a variety of transfection reagents can be utilized, examples including DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Roche #1811169), etc. An example of method 1) is a transfection method using calcium phosphate, in which DNA that enters cells is incorporated into phagosomes, but is also incorporated into the nuclei at sufficient amounts (Graham, F. L. and Van Der Eb, J., Virology 52, 456, 1973; Wigler, M. and Silverstein, S., Cell 11, 223, 1977). Chen and Okayama have investigated the optimization of this transfer technique, reporting that optimal precipitates can be obtained under conditions wherein 1) cells are incubated with co-precipitates in an atmosphere of 2% to 4% CO2 at 35°C for 15 to 24 hours; 2) circular DNA having a higher activity than linear DNA is used; and 3) DNA concentration in the precipitate mixture is 20 to 30 μg/ml (Chen, C. and Okayama, H., Mol. Cell. Biol. 7, 2745, 1987). Method 2) is suitable for transient transfection. In an older known method, a DEAE-dextran (Sigma #D-9885, M.W. 5x 10°) mixture is prepared in a desired DNA concentration ratio, and transfection is performed. Since many complexes are decomposed inside endosomes, chloroquine may be added to enhance results (Calos, M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3015, 1983). Method 3) is referred to as electroporation, and is more versatile than methods 1) and 2) because it doesn't involve cell selectivity. Method 3) is said to be efficient when conditions are optimal for pulse electric current duration, pulse shape, electric field potency (the gap between electrodes, voltage), buffer conductivity, DNA concentration, and cell density.

Of the above three categories, method 2) is easily operable,

and facilitates examination of many test samples using a large numbers of cells. Transfection reagents are therefore suitable for cases where DNA is introduced into cells for vector reconstitution. Preferably, Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat. No. 301305) or DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat. No. 1811169) is used, but the transfection reagents are not limited thereto.

Specifically, the reconstitution of viral vectors from cDNA can be performed, for example, as follows:

10

20

25

30

35

kidney-derived LLC-MK2 cells are cultured approximately 100% confluency in 24-well to 6-well plastic culture plates, or 100 mm diameter culture dishes and such, using a minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin). These cells are then infected, for example, at 2 PFU/cell with recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase. This virus has been inactivated by UV irradiation treatment for 20 minutes in the presence of 1 μ g/ml psoralen (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996). The amount of psoralen added and the UV irradiation time can be appropriately adjusted. One hour after infection, the lipofection method or the like is used to transfect cells with 2 μq to 60 µg, more preferably 3 µg to 20 µg, of the above-described DNA, which encodes the genomic RNA of the recombinant Sendai virus. Such methods use Superfect (QIAGEN), and plasmids which express the trans-acting viral proteins required for the production of viral RNP (0.5 μ g to 24 μ g of pGEM-N, 0.25 μ g to 12 μ g of pGEM-P and 0.5 μ g to 24 μg of pGEM-L) (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996). The ratio of expression vectors encoding N, P, and L is preferably 2:1:2. The amount of plasmid is appropriately adjusted, for example, to 1 μ g to 4 μ g of pGEM-N, 0.5 μ g to 2 μ g of pGEM-P, and 1 μ g to 4 μg of pGEM-L.

The transfected cells are cultured in a serum-free MEM containing 100 $\mu g/ml$ each of rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) if desired, more preferably containing only 40 $\mu g/ml$ of cytosine arabinoside (AraC) (Sigma). Reagent concentrations are optimized for minimum vaccinia virus-caused cytotoxicity, and maximum recovery rate

of the virus (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996). After transfection, cells are cultured for about 48 hours to about 72 hours, recovered, and then disrupted by three repeated freezing and thawing cycles. LLC-MK2 cells are re-transfected with the disrupted cells and then cultured. RNP may be introduced to cells as a complex formed together with, for example, lipofectamine and a polycationic liposome. Specifically, a variety of transfection reagents can be utilized. Examples of these are DOTMA (Roche), Superfect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Roche #1811169), etc. Chloroquine may be added to prevent RNP decomposition in endosomes' (Calos, M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3015, 1983). In cells transfected with RNP, the steps of expressing viral genes from RNP and replicating RNP proceed to amplify the vector. By diluting the obtained cell lysate and repeating amplification, vaccinia virus vTF7-3 can be completely removed. Reamplification may be repeated, for example, 3 times or more. The obtained RNP can be stored at -80°C.

10

15

20

25

30

35

Host cells used for reconstitution are not restricted so long as the viral vector can be reconstituted. For example, in the reconstitution of the Sendai virus vector and such, monkey kidney-derived LLC-MK2 cells and CV-1 cells, cultured cells such as hamster kidney-derived BHK cells, human-derived cells, and such, can be used. By expressing a suitable envelope protein in these cells, infective virions comprising this protein in the envelope can be obtained.

When the M gene in the viral genome is defective or deleted, viral particles are not formed from cells infected with such virus. Therefore, even though the vectors of this invention can be prepared as RNP or cells comprising RNP by the methods as described above, the vectors cannot be prepared as viral particles. Furthermore, after the transfection of RNPs, RNPs that proliferated in the cell are transmitted only to contacting cells. Therefore, infection spreads slowly which makes the production of large amounts of viral vector in high titers difficult. The present invention provides a method for producing the vectors of this invention as viral particles. Viral particles are more stable in solution as compared to RNPs. In addition, by letting the viral particles have infectivity, the vectors can be

introduced to target cells through simple contact without a transfection reagent and such. Therefore, the viral particles are particularly useful in industrial application. As a method for producing the vectors of this invention as viral particles, the virus is reconstituted under permissive conditions using a viral genome comprising an M gene having a conditional mutation. Specifically, the M protein functions to form particles by culturing cells transfected with a complex obtained through the above-described step (a) or steps (a) and (b) under permissive conditions. A method for producing viral particles that comprise genomic RNA encoding the mutant M protein having conditional mutation comprises the steps of: (i) amplifying the RNP, which comprises N, P, and L proteins of paramyxovirus and the genomic RNA, intracellularly under conditions permissive for the mutant M protein; and (ii) collecting viral particles released into the cell culture supernatant. For example, a temperature-sensitive mutant M protein may be cultured at its permissive temperature.

10

20

25

30

35

Another method for producing the vectors of the present invention as viral particles uses helper cells that express the M protein. By using M helper cells, the present inventors produced a vector wherein the cleavage site of the F protein is modified to a sequence that is cleaved by another protease and the M gene is mutated or deleted as viral particles. Since the method of this invention does not require a helper virus, such as the wild-type paramyxovirus, contamination by an M gene-comprising virus having particle forming ability does not occur. Thus, the vectors of this invention can be prepared in a pure form. The present invention provides viral particles which comprises (i) a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a nucleic acid encoding the M protein is mutated or deleted, and (b) a modified F protein whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that is cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein is encoded, further wherein the viral particle: (1) has the ability to replicate the genomic RNA in a cell transfected with the viral particle; (2) shows significantly decreased or eliminated production of a viral particle in the intrahost environment; and (3) has the ability to introduce the genomic RNA in a cell that contacts

with the cell transfected with the viral particle comprising the genomic RNA in the presence of the protease. According to a preferred embodiment, such viral particle will not produce viral particles.

A method for producing the viral particles of this invention in cells expressing a functional M protein may comprise the steps of: (i) amplifying the RNP, comprising N, P, and L proteins of the paramyxovirus, and the genomic RNA in cells expressing wild-type M protein of paramyxovirus or equivalent proteins thereto; and (ii) collecting the viral particles released into the cell culture supernatant. So long as the wild-type M protein has activity to form viral particles, it may be derived from a paramyxovirus from which the genomic RNA is not derived. Furthermore, a tag peptide and such may be added to the protein, or alternatively, when it is expressed through an appropriate expression vector, a linker peptide derived from the vector may be added to the protein. As described above, the protein to be used does not have to be the wild-type M protein itself but may be a protein having viral particle-forming ability equivalent to the wild-type protein. A viral particle produced from M protein-expressing cells comprises the M protein expressed in these cells in its envelope; however, it does not comprise the gene encoding this protein. Therefore, the wild-type M protein is no longer expressed in cells infected with this virus. Thus, viral particles cannot be formed.

20

25

35

Production of helper cells expressing the M protein can be performed as described below. To prepare a vector that expresses the M protein in an inducible fashion, for example, inducible promoters or expression regulating systems using recombination (such as Cre/loxP) are used. A Cre/loxP inducible expression plasmid can be constructed using, for example, a plasmid pCALNdlw, which has been designed to inducibly express gene products using Cre DNA recombinase (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1115-1121, 1998). As cells capable of expressing M proteins, helper cell lines capable of persistently expressing M proteins are preferably established by inducing M genes introduced into their chromosomes. For example, the monkey kidney-derived cell line LLC-MK2 or the like can be used for such cells. LLC-MK2 cells are cultured at 37°C in MEM containing 10%

heat-treated immobilized fetal bovine serum (FBS), 50 units/ml sodium penicillin G, and 50 μ g/ml streptomycin, under an atmosphere of 5% CO₂. The above-mentioned plasmid, which has been designed to inducibly express the M gene products with Cre DNA recombinase, is introduced into LLC-MK2 cells using the calcium-phosphate method (mammalian transfection kit (Stratagene)) according to a known protocol.

For example, 10 μ g of M-expression plasmid may be introduced into LLC-MK2 cells grown to be 40% confluent in a 10-cm plate. These cells are then incubated in an incubator at 37°C, in 10 ml of MEM containing 10% FBS and under 5% CO₂. After 24 hours of incubation, the cells are harvested and suspended in 10 ml of medium. The suspension is then plated onto five dishes of 10-cm diameter: 5 ml of the suspension are added to one dish, 2 ml to two dishes, and 0.2 ml to two dishes. The cells in each dish are cultured with 10 ml of MEM containing 10% FBS and 1200 μ g/ml G418 (GIBCO-BRL) for 14 days; the medium is changed every two days. Thus, cell lines in which the gene has been stably introduced are selected. The G418-resistant cells grown in the medium are harvested using cloning rings. Cells of each clone harvested are further cultured to confluence in a 10-cm plate.

15

20

25

30

35

High level expression of the M protein in helper cells is important in recovering a high titer virus. For this purpose, for example, the above selection of M-expressing cells is preferably carried out twice or more. For example, an M-expressing plasmid comprising a drug-resistance marker gene is transfected, and cells comprising the M gene are selected using the drug. Following this, an M-expressing plasmid comprising a marker gene resistant to a different drug is transfected into the same cells, and cells are selected using this second drug-resistance marker. Cells selected using the second marker are likely to express M protein at a higher level than cells selected after the first transfection. M-helper cells constructed through twice-repeated transfections can be suitably applied. Since the M-helper cells can simultaneously express the F gene, production of infective viral particles deficient in both F and M genes is possible (WO 03/025570). In this case, transfection of the F-gene-expressing plasmids more than twice is

also suggested to raise the level of F protein expression induction. The genes of modified F proteins as described Herein can be used as F genes.

An M protein induction expression may be achieved by incubating cells to confluence in a 6-cm dish, and then, for example, infecting these cells with adenovirus AxCANCre at MOI= ~3, according to the method of Saito et al. (Saito et al., Nucleic Acids Res. 23, 3816-3821, 1995; Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1998).

10

20

25

30

To produce the virus particles of the present invention using cells that express wild-type M protein or an equivalent protein (M helper cells), the above-described RNP of the present invention may be introduced into these cells and then cultured. RNP can be introduced into M helper cells, for example, by the transfection of RNP-containing cell lysate into M helper cells, or by cell fusion induced by the co-cultivation of RNP-producing cells and M helper cells. It can also be achieved by transcribing genomic RNA into M helper cells and conducting de novo RNP synthesis under the presence of N, P, and L proteins.

Above-described step (i) (the step of amplifying RNP using an M helper cell) is preferably carried out at a low temperature in the In the production of a vector using a present invention. temperature-sensitive mutant M protein, the process of producing viral particles is necessarily carried out at temperatures below the the present permissive temperature. However, surprisingly, inventors found that in the present method, efficient particle production was possible when the process of viral particle formation was carried out at low temperatures, even when using the wild-type M protein. In the context of the present invention, the term "low temperature" means 35°C or less, preferably 34°C or less, more preferably 33°C or less, and most preferably 32°C or less.

According to the present invention, viral particles can be released into the external fluid of virus-producing cells, for example, at a titer of 1×10^5 CIU/ml or more, preferably 1×10^6 CIU/ml or more, more preferably 5×10^6 CIU/ml or more, more preferably 1×10^7 CIU/ml or more, more preferably 5×10^7 CIU/ml or more, more preferably 1×10^8 CIU/ml or more, and more preferably 5×10^8 CIU/ml or more. The

virus titer can be measured by the methods described in the specification and other literature (Kiyotani, K. et al., Virology 177(1), 65-74, 1990; WO 00/70070).

One preferred embodiment of a method for reconstituting a recombinant viral vector from the M-deficient viral genome cDNA is as follows: Namely, the method comprises the steps of (a) transcribing a DNA encoding the (negative-stranded or positive-stranded) genomic RNA in cells expressing the viral proteins necessary for the formation of infective viral particles (i.e., NP, NP, P, L, M, F, and HN proteins); (b) co-culturing these cells with cells expressing chromosomally integrated M gene (i.e., M helper cells); (c) preparing a cell extract from this culture; (d) transfecting the cells expressing the chromosomally integrated M gene (i.e., M helper cells) with the extract and culturing these cells; and (e) recovering viral particles from the culture supernatant. Step (d) is preferably carried out under the low temperature conditions described above. The obtained viral particles can be amplified by re-infection of helper cells (preferably at low temperatures). Specifically, the virus can be reconstituted according to the description in the Examples. The recovered viral particles can be diluted and then infected again to M helper cells to be amplified. This amplification step can be performed repeatedly two or three times or more. The obtained virus stock can be stored at -80°C. The virus titer can be determined by measuring the hemagglutination activity (HA). HA can be determined by the "end-point dilution method".

10

15

20

25

30

35

Specifically, first, LLC-MK2 cells are plated onto a 100-mm dish at a density of 5x 10⁶ cells/dish. When inducing the transcription of genomic RNA using T7 RNA polymerase, cells may be cultured for 24 hours and then infected at room temperature for one hour with T7 polymerase-expressing recombinant vaccinia virus (PLWUV-VacT7) at MOI= approximately 2, which has been treated with psoralen and long-wavelength ultraviolet light (365 nm) for 20 minutes (Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986). After the cells are washed with serum-free MEM, plasmids expressing the genomic RNA and plasmids expressing the N, P, L, F, and HN proteins of paramyxoviruses, respectively, are used to transfect cells using

appropriate lipofection reagents. The ratio of plasmids can be, for example, 6:2:1:2:2:2, but it is not limited thereto. After culturing for five hours, the cells are washed twice with serum-free MEM, and cultured containing MEM in cytosine- β -D-arabinofuranoside (AraC, Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 μ g/ml trypsin (GIBCO-BRL, Rockville, MD). After culturing for 24 hours, the cells are overlaid with cells that continuously express M protein (M helper cells), at a density of about 8.5x 10⁶ cells/dish, and then cultured for a further two days at 37°C in MEM containing 40 μg/ml AraC and 7.5 μg/ml trypsin (P0). The cultured cells are collected and the precipitate is suspended in 2 ml/dish OptiMEM. After repeating the cycle of freezing and thawing for three times, the lysate is directly transfected to the M helper cells and the cells are cultured at 32°C in serum-free MEM containing 40 µg/mL AraC and proteases that cleaves the F protein (P1). A portion of the culture supernatant is collected three to 14 days later, infected into freshly prepared M helper cells, and then cultured at 32°C in serum-free MEM containing 40 µg/mL ÅraC and the protease (P2). Three to 14 days later, freshly prepared M helper cells are reinfected, and cultured in the presence (for preparing F-cleaved virus) or absence (for preparing F-uncleaved viral particle) of the protease for three to seven days at 32°C using serum-free MEM (P3). By repeating the reamplification three times or more, the initially used vaccinia virus can be completely eliminated. BSA is added to the collected culture supernatant at a final concentration of 1%, and this is stored at -80°C.

10

15

20

35

The viral particle of this invention may be an infectious particle whose modified F protein is cleaved, or may be a potentially infectious viral particle having no infectivity in its initial form but becoming infective upon treatment with a protease that cleaves the modified F protein. The modified F protein encoded by the genome exists on the envelope of the viral particle; however, it lacks infectivity when left uncleaved. This kind of virus acquires infectivity though the treatment with a protease that cleaves the cleavage sequence of this modified F protein, or through contact with cells or tissues in the presence of the protease to cleave the F protein. In order to obtain viral particles whose modified F protein is not

cleaved through the above virus production using virus producing cells, the final step of virus amplification step may be performed in the absence of proteases that cleave the modified F protein. On the other hand, preparation of the virus in the presence of the protease allows production of infective viral particles with cleaved F protein.

Furthermore, by expressing, in the cell, an envelope protein that is not encoded in the viral genome during viral particle production, a viral particle comprising this protein in its envelope can be produced. An example of such an envelope protein is the wild-type F protein. The viral particle produced in this manner encodes the modified F protein on its genomic RNA and carries the wild-type F protein in addition to this modified protein on its envelope. By providing the wild-type F protein in trans at the step of viral particle production and amplifying in the presence of trypsin that cleaves the protein, the viral particles become infective through the cleavage of the wild-type F protein on the viral particles. According to this method, even if a protease that cleaves the modified F protein is not used, infective viral particles can be prepared at high titers. Therefore, the viral particles of this invention may be viral particles comprising the wild-type F protein of a paramyxovirus. The wild-type F protein does not necessarily have to be derived from the same type of paramyxovirus as the viral genome, and may be an envelope protein from another paramyxovirus.

10

20

25

30

35.

Moreover, viral particles comprising any desired viral envelope protein other than the wild-type F protein in the envelope can be produced. Specifically, during reconstitution of the virus, the desired envelope protein may be expressed in cells to produce viral vectors comprising this envelope protein. There are no particular limitations to these proteins. A preferred example includes the G protein (VSV-G) of vesicular stomatitis virus (VSV). The viral particles of the present invention comprise pseudotype viral vectors which comprise envelope proteins, such as the VSV-G protein, derived from viruses other than the virus from which the genomic RNA has been derived. As in the case with the wild-type F protein, this protein will not be expressed from the viral vector after infection of the viral particle into cells, since this envelope protein is not encoded

on the genomic RNA of the virus.

10

15

20

25

30

35

The viral particles of this invention may comprise chimeric proteins, for example, which comprise on the extracellular region, one or more proteins that can adhere to specific cells on the surface of the envelope, such as adhesion factors, ligands, receptors, and antibodies or fragments thereof, and polypeptides derived from the viral envelope in the intracellular region. This enables the production of vectors that infect specific tissues as targets. These can be provided in trans by intracellular expression during reconstitution of the viral vectors. Specific examples include fragments comprising the receptor binding domain of soluble factors such as cytokines, or antibody fragments against cell surface proteins (WO 01/20989).

When preparing a vector having deficient viral genes, for example, two or more vector types, each of which has a different deficient viral gene in its viral genome, may be introduced into the same cells. Each deficient viral protein is then expressed and supplied by the other vector. This mutual complementation results in the formation of infective viral particles, and the viral vector can be amplified in the replication cycle. Namely, when two or more types of vector of the present invention are inoculated in combination to complement viral proteins, mixed viral gene-deficient viral vectors can be produced on a large scale and at a low cost. As these viruses lack viral genes, their genome is smaller than that of an intact virus, and they can thus comprise larger foreign genes. In addition, co-infectivity is difficult to maintain in these viruses, which are non-propagative due to viral gene deficiency and diluted outside of cells. Such vectors are thus sterile, which is advantageous from the viewpoint of controlling environmental release.

Large amounts of a viral vector may be obtained by infecting the viral vector obtained by the above-described method into embryonated chicken eggs to amplify the vector. For example, M gene-transgenic chickens can be generated and the vectors may be inoculated to the chicken eggs for amplification. The basic method for producing viral vectors using chicken eggs has already been developed ("Shinkei-kagaku Kenkyu-no Saisentan Protocol III, Bunshi

Shinkei Saibou Seirigaku (Leading edge techniques protocol III in neuroscience research, Molecular, Cellular Neurophysiology)", edited by Nakanishi, et al., KOSEISHA, Osaka, pp. 153-172, 1993). Specifically, for example, fertilized eggs are moved to an incubator and the embryo is grown under culture for nine to twelve days at 37°C to 38°C. The viral vector is then inoculated into the allantoic membrane cavity, the egg is incubated for a few days to proliferate the viral vector. The allantoic fluid containing the virus is then collected. Conditions such as culture duration change according to the recombinant virus amplified. Separation and purification of the viral vector from the allantoic fluid is done according to conventional methods ("Protocols of Virology" by Masato Tashiro, edited by Nagai and Ishihama, Medical View, pp.68-73, 1995).

10

15

20

25

35

The recovered virus vectors can be purified to substantial purity. Purification can be performed by known purification and separation methods including filtration, centrifugation, column chromatographic purification, and such, or combinations thereof. The phrase "substantial purity" used herein means that the virus vectors, as components, are the main proportion of the sample in which they exist. Typically, substantially pure viral vectors can be detected by confirming that the ratio of virus-derived protein to total protein in the sample (except protein added as a carrier or stabilizer) is 10% or more, preferably 20% or more, more preferably 50% or more, more preferably 70% or more, more preferably 80% or more, and even more preferably 90% or more. Specifically, paramyxoviruses can be purified, for example, by a method in which cellulose sulfate ester or crosslinked polysaccharide sulfate ester is used (JP-B No. Sho 62-30752; JP-B Sho 62-33879; JP-B Sho 62-30753), a method in which adsorption to fucose sulfate-containing polysaccharide and/or a decomposition product thereof is used (WO 97/32010), etc.

The M gene-deficient vector whose F cleavage site is modified transmits the vector intracellularly, in the presence of a specific protease, by cell fusogenic infection alone. Therefore, the vector of this invention is useful in gene therapy targeting tissues expressing a certain protease. Normal vectors enable gene transfer into the surface layer of the target tissue; however, they are incapable

of penetrating to the interior of the tissue. On the other hand, the vectors of this invention have the ability infiltrate deeply into target tissues having enhanced protease activity. For example, the vectors of this invention can be transmitted to the interior of cancer cells deeply infiltrated into normal tissues by infecting to a portion of vector-infectable cancer cells at the surface layer.

The vectors of the present invention can be applied to cancer, arteriosclerosis, articular diseases such as rheumatoid arthritis (RA), and the like. For example, in articular diseases such as RA, destruction of the higher order structure of the cartilage by extracellular matrix degradation proceeds as described above, and the joint is destroyed. By removing cells whose ECM degradation enzyme activity is enhanced through the vector of this invention, articular destruction is expected to be diminished. Furthermore, arteriosclerosis, accumulation of macrophage-derived foam cells proceeds. The foam cells secrete a large amount of metalloproteinase and, as a result, destroy the fibrous hyperplasia to cause plaque breakdown. By killing the macrophages that express MMP using the vectors of this invention, treatment of such arteriosclerosis is Moreover, as described below, various proteases are achieved. activated in cancer. The vectors of this invention are useful as therapeutic vectors that infect and infiltrate in a cancer-specific manner.

10

15

20

25

30

35

To produce a composition comprising a vector of the present invention, the vector can be combined, as necessary, with a desired pharmaceutically acceptable carrier or solvent. A "pharmaceutically acceptable carrier or solvent" refers to a material that can be administered along with the vector and that does not significantly inhibit gene transfer of that vector. For example, vectors can be formulated into compositions by appropriately diluting with physiological saline, phosphate-buffered physiological saline (PBS), or such. When the vectors are propagated in chicken eggs or such, the composition may contain allantoic fluid. Furthermore, compositions comprising the vector may contain carriers or solvents such as deinonized water and 5% dextrose solution. In addition to these, the composition can contain vegetable oil, suspending agents,

detergents, stabilizers, biocides, etc. Further, preservatives and other additives can be added to the composition. Compositions comprising the present vectors are useful as reagents and pharmaceuticals.

Vector dosage depends on the type of disease, the patient's weight, age, sex and symptoms, the purpose of administration, the dosage form of the composition to be administered, the method for administration, type of gene to be introduced, etc. However, those skilled in the art can routinely determine the proper dosage. The administration dose of a vector is preferably within about 105 to 1011 CIU/ml, more preferably within about 10⁷ to 10⁹ CIU/ml, most preferably within about 1x 10⁸ to 5x 10⁸ CIU/ml. It is preferable to administer the vector mixed with pharmaceutically acceptable carriers. administration to carcinoma tissues, vectors can be administered to multiple points in the target site so that they distribute uniformly. The preferred dose for each administration to a human individual is 2x 109 to 2x 1010 CIU. Administration can be carried out one or more times within the limits of clinically acceptable side effects. The frequency of daily administration can be similarly determined. When administering the viral vector to animals other than humans, for example, the dose to be administered can be determined by converting the above dose based on the weight ratio, or the volume ratio of the administration target sites (for example, an average value) between the target animals and humans. Compositions comprising the vectors of the present invention can be administered to all mammalian species including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, dogs, etc.

10

25

35

The vectors of this invention are particularly useful in treating cancer. Cells infected with the vectors of this invention form syncytia by cell fusion under the presence of a protease. Utilizing this characteristic, the vectors of this invention can be used for treating cancers with enhanced activity of a specific protease. The present invention provides therapeutic compositions for cancers which comprise pharmaceutically acceptable carriers and the vectors of this invention encoding an F protein that is cleaved by a protease showing enhanced activity in cancers. Furthermore, the present invention

relates to the use of the vectors in producing therapeutic compositions for cancer. The present invention further provides methods for treating cancer which comprise the step of administering such vectors to cancer tissues. Since the activity of ECM degradation enzyme is enhanced in infiltrating and metastatic malignant cancers, a vector comprising the gene of an F protein that is cleaved by ECM degradation enzyme can be used for specific infection to malignant cancers to cause death of the cancer tissues.

A vector of the present invention can further comprise foreign genes. The foreign gene may be a marker gene for monitoring infection by the vector or a therapeutic gene for cancer. Examples of therapeutic genes include cell-inducible genes for apoptosis and such; genes encoding cytotoxic proteins; cytokines; and hormones. The administration of the vectors of this invention to cancers can be direct (in vivo) administration to cancers or indirect (ex vivo) administration, wherein the vector is introduced into patient-derived cells or other cells, and the cells are then injected to cancers.

The targeted cancer may be any cancer in which the activity of a specific protease is enhanced. Examples include most invasive and metastatic malignant tumors (lung cancer, gastric cancer, colon cancer, esophageal cancer, breast cancer, and such). However, proteases such as MMP, uPA, and tPA are expressed at low levels in some malignant cancers. Therefore, whether the cancer can be targeted is judged according to presence or absence of enhanced protease activity. The vectors of this invention are particularly useful for application to a cancer that has infiltrated to the submucosal layer in esophageal cancer, colon cancer progressed in the intrinsic sphincter to stage III and IV cancer, and invasive melanoma deeply infiltrated so that it cannot be completely removed by surgery.

30

35

10

20

25

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 is a schematic representation of the construction of an F-deficient SeV genome cDNA in which a temperature-sensitive mutation has been introduced into the M gene.

Fig. 2 depicts the structures of viral genes constructed to suppress secondary particle release based on temperature-sensitive

mutations introduced into the M gene, and viral genes constructed or used to test and compare the effects of these introduced mutations.

Fig. 3 provides microscopic images representing GFP expression in cells (LLC-MK2/F7/A) persistently expressing F protein, which were cultured at 32°C and 37°C, respectively, for six days after infection with SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP.

Fig. 4 is a picture representing the result of semi-quantitative determination, over time and using Western blotting, of F protein expression levels in cells (LLC-MK2/F7/A) persistently expressing SeV-F protein, which were cultured in trypsin-free, serum-free MEM at 32°C or 37°C.

10

20

25

30

35

Fig. 5 provides microscopic images representing GFP expression in LLC-MK2 cells which were cultured at 1 32°C, 37°C or 38°C for three days after infection with SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3.

Fig. 6 depicts hemagglutination activity (HA activity) in the culture supernatant, which was sampled over time (supplemented with fresh medium at the same time), of LLC-MK2 cells cultured at 32°C, 37°C or 38°C after infection with SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3.

Fig. 7 provides pictures representing the ratio of M protein level in cells to that in virus-like particles (VLPs). This ratio was determined by Western blotting using an anti-M antibody. The culture supernatant and cells were recovered from a LLC-MK2 cell culture incubated at 37°C for two days after infection with SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3. Each lane contained the equivalent of 1/10 of the content of one well from a 6-well plate culture.

Fig. 8 depicts SEAP activity in the culture supernatant of LLC-MK2 cells cultured for 12, 18, 24, 50, or 120 hours after infection with SeV18+SEAP/ Δ F-GFP or SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3.

Fig. 9 depicts HA activity in the culture supernatant of LLC-MK2 cells cultured for 24, 50, or 120 hours after infection with SeV18+SEAP/ Δ F-GFP or SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3.

Fig. 10 is a picture representing the quantity of VLPs determined by Western blotting using an anti-M antibody. LLC-MK2 cells were

cultured for five days after infection with SeV18+SEAP/ Δ F-GFP or SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3. The culture supernatant was centrifuged to recover the viruses. Each lane contained the equivalent of 1/10 of the content of one well from a 6-well plate culture.

Fig. 11 depicts cytotoxicity estimates based on the quantity of LDH released into the cell culture medium. LLC-MK2, BEAS-2B or CV-1 cells were infected with SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, or 10. Cells were cultured in a serum-free or 10% FBS-containing medium, and the cytotoxicity assay was carried out three or six days after infection, respectively. The relative cytotoxicity values of cells are represented, considering the cytotoxicity of equal numbers of cells, 100% of which are lysed by cell denaturant (Triton), as 100%.

10

15

20

25

30

35

Fig. 12 provides pictures representing the subcellular localization of the M protein in LLC-MK2 cells cultured at 32°C, 37°C or 38°C for two days after infection with SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ -F-GFP at MOI= 1, which was observed by immunostaining using an anti-M antibody.

Fig. 13 provides stereo three-dimensional images for the subcellular localization of the M and HN proteins observed under a confocal laser microscope. A-10 cells were infected with SeV18+SEAP/ Δ F-GFP or SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 1, and then cultured in medium containing 10% serum at 32°C or 37°C for one day. These images were obtained by immunostaining using an anti-M antibody and anti-HN antibody.

Fig. 14 provides stereo three-dimensional images for the subcellular localization of the M and HN proteins observed under a confocal laser microscope. A-10 cells were infected with SeV18+SEAP/ Δ F-GFP or SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 1, and then cultured in medium containing 10% serum at 32°C or 37°C for two days. These images were obtained by immunostaining using an anti-M antibody and anti-HN antibody.

Fig. 15 provides pictures representing the effects of a microtubule depolymerization reagent on the subcellular localization of the M and HN proteins. A-10 cells were infected with

SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 1, and a microtubule depolymerization reagent, colchicine or colcemid, was immediately added to these cells at a final concentration of 1 μ M. The cells were cultured in medium containing 10% serum at 32°C. After two days; the cells were immunostained with an anti-M antibody and anti-HN antibody and then observed under a confocal laser microscope. These photographs show stereo three-dimensional images of the subcellular localization of the M and HN proteins.

Fig. 16 provides pictures representing the effects of a microtubule depolymerization reagent on the subcellular localization of the M and HN proteins. A-10 cells were infected with SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 1, and a microtubule depolymerization reagent, colchicine, was immediately added to the cells at a final concentration of 1 μ M. The cells were cultured in medium containing 10% serum at 32°C or 37°C. After two days, these cells were immunostained with anti-M antibody and anti-HN antibody, and then observed under a confocal laser microscope. These photographs show stereo three-dimensional images for the subcellular localization of the M and HN proteins.

10

15

20

25

30

35

Fig. 17 is a schematic representation of the construction of an M-deficient SeV genome cDNA comprising the EGFP gene.

Fig. 18 is a schematic representation of the construction of an F- and M-deficient SeV genome cDNA.

Fig. 19 depicts the structures of the constructed F- and/or M-deficient SeV genes.

Fig. 20 is a schematic representation of the construction of an M gene-expressing plasmid comprising the hygromycin-resistance gene.

Fig. 21 provides pictures representing a semi-quantitative comparison, by Western blotting, of the expression levels of the M and F proteins in cloned cells inducibly expressing the cloned M protein (and F protein); following infection with a recombinant adenovirus (Accance) that expresses Cre DNA recombinase.

Fig. 22 provides pictures representing the viral reconstitution of an M-deficient SeV (SeV18+/ Δ M-GFP) with helper cell (LLC-MK2/F7/M) clones #18 and #62.

Fig. 23 depicts the viral productivity of SeV18+/ Δ M-GFP (CIU and HAU time courses).

Fig. 24 provides pictures and an illustration representing the results of RT-PCR confirming gene structure in SeV18+/ Δ M-GFP virions.

5

10

15

2Ò

25

30

35

Fig. 25 provides pictures representing the result of a comparison of SeV18+/ Δ M-GFP with SeV18+GFP and SeV18+/ Δ F-GFP, where, after infection of LLC-MK2 cells, Western blotting was carried out on the viral proteins from these cells and cell cultures to confirm the viral structure of SeV18+/ Δ M-GFP from a protein viewpoint.

Fig. 26 provides pictures representing a quantitative comparison of virus-derived proteins in the culture supernatant of LLC-MK2 cells infected with SeV18+/ Δ M-GFP and SeV18+/ Δ F-GFP (a series of dilutions were prepared and assayed using Western blotting). Anti-SeV antibody was used.

Fig. 27 depicts HA activity in the culture supernatant, collected over time, of LLC-MK2 cells infected with SeV18+/ Δ M-GFP or SeV18+/ Δ F-GFP at MOI= 3.

Fig. 28 provides fluorescence microscopic images obtained five days after LLC-MK2 cells were infected with SeV18+/ Δ M-GFP or SeV18+/ Δ F-GFP at MOI= 3.

Fig. 29 provides fluorescence microscopic images of LLC-MK2 cells prepared as follows: LLC-MK2 cells were infected with SeV18+/ Δ M-GFP or SeV18+/ Δ F-GFP at MOİ= 3, and then five days after infection the culture supernatant was recovered and transfected into LLC-MK2 cells using a cationic liposome (Dosper). Microscopic observation was carried out after two days.

Fig. 30 depicts the design of the amino acid sequences at the F1/F2 cleavage sites (activation sites of the F protein). The recognition sequences of proteases (MMP or uPA) highly expressed in cancer cells were designed based on those of the synthetic substrates. From the top, the sequences of SEQ ID NOs: 40 to 44 are shown.

Fig. 31 is a schematic representation of the construction of an M-deficient SeV vector cDNA in which the activation site of F is modified.

Fig. 32 provides pictures representing protease-dependent cell fusogenic infection by F-modified, M-deficient Sendai viral vectors.

By using LLC-MK2, it was confirmed that modification of F causes cell fusogenic infection in a protease-dependent manner. Each of the M-deficient SeVs (SeV/ Δ M-GFP (A, B, C, J, K, and L), SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP (D, E, F, M, N, and O), and SeV/F(uPA) Δ M-GFP(G, H, I, P, O, and R)) was infected to cells with simultaneous addition of 0.1 μ g/ml collagenase (Clostridium) (B, E, and H), MMP-2 (C, F, and I), MMP-9 (J, M, and P), uPA (K, N, and Q), and 7.5 μ g/ml trypsin (L, Q, and R). Four days later, the cells were observed under a fluorescent microscope. Only in LLC-MK2 added with trypsin, SeV/\DeltaM-GFP comprising unmodified F caused cell fusion of infected cells with surrounding cells, resulting in cell fusogenic infection to form multinuclear cells, syncytia (L). In LLC-MK2 to which collagenase, MMP-2, and MMP-9 were added, SeV/F (MMP#2) ΔM-GFP comprising an MMP degradation sequence introduced in F caused cell fusogenic infection to form syncytia (E, On the other hand, SeV/(uPA) AM-GFP comprising and M). urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type PA (tPA) degradation sequences introduced in F was observed to cause cell fusogenic infection under the presence of trypsin, and by further modification, formation of syncytia was observed under the presence of uPA (Q and R).

10

20

25

30

35

Fig. 33 provides pictures representing protease-dependent cell fusogenic infection of cancer cells by F-modified, M-deficient Sendai viral vectors. Experiments were performed to test whether endogenous protease-selective cell fusogenic infection can be observed. The following cells were used: HT1080, an MMP-expressing cancer cell strain (A, D, and G); MKN28, a tPA-expressing strain (B, E, and H); and SW620, cell strain expressing neither of these proteases (C, F, and I). In HT1080, the infection spread only with SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP ten times or more (D). In tPA-expressing strain MKN28, cell fusogenic infection was observed to spread only with SeV/F(uPA) Δ M-GFP. In SW620 expressing neither of these proteases, no spread of infection could be observed.

Fig. 34 provides pictures representing MMP induction by phorbol ester and induction of cell fusogenic infection by an F-modified, M-deficient Sendai viral vector. The expression of MMP-2 and MMP-9 was confirmed by gelatin zymography in which the portion where

gelatinolytic activity exists becomes clear (A). Lane C represents the control. Lane T shows the result wherein the supernatant obtained after induction with 20 nM PMA was used. A band corresponding to MMP-9 was observed in HT1080 and Panc I, proving induction of MMP-9. Regarding MMP-2, latent MMP-2 having hardly any activity is detected in Panc I before induction. As indicated in Fig. 34B, SeV/F (MMP#2) Δ M-GFP displayed cell fusogenic infection due to MMP-9 induction.

10

15

20

25

30

35

Fig. 35 provides pictures representing cell fusogenic infection of an F-modified, M-deficient Sendai viral vector in vivo. HT1080 carcinoma-bearing nude mice were prepared. Among them, animals having carcinoma with a diameter of more than 3 mm, seven to nine days after subcutaneous injection were used. A fifty µL dose of SeV was injected once into the animals. Two days later, the carcinoma was observed under a fluorescent microscope. Panels A, D, G, and J are bright field images; B, E, H, and K are the corresponding fluorescent images of GFP; and C, F, I, and L are their enlarged images. Fluorescence was observed only in the region surrounding the site to which SeV-GFP and SeV/ Δ M-GFP, respectively, had been injected (panels E and H). In contrast, injection of SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP was observed to spread the fluorescence throughout the entire cancer (panel K). In the enlarged images, fluorescence in each of the cells can be confirmed for SeV-GFP and SeV/ Δ M-GFP; however, the shapes of the cells were unclear for SeV/F(MMP#2)ΔM-GFP which suggests occurrence of cell fusion.

Fig. 36 depicts cell fusogenic infection of an F-modified, M-deficient Sendai viral vector in vivo. The percentages of GFP to the entire cancer in the pictures of Fig. 35 were measured from their areas using NIH image. As a result, SeV-GFP and SeV/ Δ M-GFP showed 10% and 20% infections, respectively; whereas SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP showed 90% infection, suggesting obvious spreading of infection.

Fig. 37 depicts the antitumor effects of F-modified, M-deficient SeV vectors in carcinoma-bearing nude mice. The volume of the carcinoma of the mice assayed in Fig. 35 was measured. Four groups of SeVs were injected into carcinomas with a diameter of 3 mm or more. Reinjection was performed two days later, and the size of the carcinoma

was measured. Carcinomas to which PBS, SeV-GFP, and SeV/ Δ M-GFP were injected showed rapid growth. In contrast, those injected with SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP demonstrated in the assays of Fig. 36 to spread throughout the entire carcinoma clearly did not proliferate and remained small. Significant antitumor effects as compared to the other three groups was observed at P< 0.05 according to the t-test.

Fig. 38 provides pictures representing protease expression-selective infection of an F-uncleaved, F-modified, M-deficient SeV vector to cancer cells. The possibility of selective infection by protease expression was examined in MMP-expressing HT1080 strain, tPA-expressing MKN28 strain, and SW620 that hardly expresses proteases. Infection by SeV/F(MMP#2)ΔM-GFP was observed in MMP-expressing HT1080 strain, but not in tPA-expressing MKN28 strain. Infection by SeV/F(uPA)ΔM-GFP was observed in tPA-expressing MKN28 strain, but in MMP-expressing HT1080 strain.

10

15

20

25

30

35

Fig. 39 provides pictures representing the acquisition of infection ability via the F_Tuncleaved, F-modified, M-deficient SeV vector due to MMP-3 and MMP-7 induction by fibroblasts. Changes in the infectivity of the F-modified, M-deficient SeV vector due to MMP induction by fibroblasts in vitro was examined using SW480 and WiDr. Co-culturing human fibroblasts (hFB) with SW480 and WiDr caused infection of SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP (B and D). Such phenomenon was not observed in SW620 where induction did not take place (F).

Fig. 40 provides pictures representing MMP-selective infection of an F-modified, M-deficient SeV vector to human aortic smooth muscle cells. Infection of SeV/ Δ M-GFP proceeds only by the addition of trypsin. In contrast, the infection of SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP proceeds with collagenase, MMP-2, MMP-3, and MMP-9.

Fig. 41 provides pictures representing the cleavage of the protease-dependent F protein within the F-modified, M-deficient SeV vector. The protease-dependent cleavage of F0 of Sendai virus to F1 was confirmed by Western blotting. An M-deficient SeV vector comprising unmodified F (shown in lanes 1, 4, 7, and 10), an M-deficient SeV vector with insertion of an MMP#2 sequence into F (shown in lanes 2, 5, 8, and 11), and an M-deficient SeV vector with insertion of a uPA sequence into F (shown in lanes 3, 6, 9, and 12) were treated

with above-described proteases (untreated (lanes 1, 2, and 3); 0.1 ng/mL MMP-9 (lanes 4, 5, and 6); 0.1 ng/mL uPA (lanes 7, 8, and 9); and 7.5 µg/mL trypsin (lanes 10, 11, and 12)) at 37°C for 30 minutes. As a result, F1 cleavage occurred depending on the inserted protease substrates. Namely, trypsin cleaved the F protein of the F-unmodified M-deficient SeV vector, MMP-9 cleaved that of the M-deficient SeV vector having the MMP#2 sequence inserted into the F protein, and uPA cleaved that of the M-deficient SeV vector having the uPA sequence inserted into the F protein.

Fig. 42 depicts the production of cytoplasmic domain deletion mutants of F, and compares their fusogenicity through simultaneous expression with HN. Fig. 42A is a schematic representation of the construction of the cytoplasmic domain deletion mutants of Sendai viral F protein. From the top, SEQ ID NOs: 76 to 79. Fig. 42B depicts the production of cytoplasmic domain deletion mutants of the F protein and the comparison of fusogenicity due to simultaneous expression with HN. Each of the cytoplasmic domain deletion mutants of Sendai viral F protein and HN were expressed simultaneously in LLC-MK2 cells added with 7.5 μ g/mL trypsin. Four days later, nuclear staining was performed with hematoxylin, and the number of nuclei that underwent syncytium formation was counted.

10

20

25

30

35

Fig. 43 depicts the drastic increase of fusogenicity resulting from the F/HN chimeric protein. Fig. 43A shows the structure of the F/HN chimeric protein. The linker sequence is described in SEQ ID NO: 80. Fig. 43B shows the increased fusogenicity of the F/HN chimeric protein by the insertion of a linker. Each of the Sendai viral F/HN chimeric proteins and HN were expressed simultaneously in LLC-MK2 cells added with 7.5 μ g/mL trypsin.

Fig. 44 provides a schematic representation and pictures depicting the outline of the MMP substrate sequence insertion into the F cleavage site of the F/HN chimeric proteins. Fig. 44A is a schematic representation of the construction of F-modified F/HN chimeric proteins inserted with MMP substrate sequences. From the top, SEQ ID NOs: 81 to 89. Fig. 44B depicts the syncytium formation due to the expression of F-modified F/HN in MMP-expressing HT1080 cells.

Fig. 45 depicts the modification of the F peptide (fusion peptide) and its concentration-dependent effect on syncytium formation. Fig. 45A is a schematic representation of the construction of modified fusion peptides. From the top, SEQ ID NOs: 90 to 93. Fig. 45B depicts the fusogenicity of MMP#2, MMP#6, and MMP#6G12A relative to the concentration of added collagenase (Clostridium).

Fig. 46 depicts the genomic structure of the improved F-modified M-deficient Sendai viruses.

Fig. 47 provides pictures representing the spreading of the improved F-modified, M-deficient Sendai viruses in cancer with low expression levels of MMP. The spread of cell fusion 2 days after infection of the improved F-modified M-deficient Sendai viruses are shown.

Fig. 48 is a picture representing MMP-2 and MMP-9 expression in cancer cell lines. Gelatin zymography of the supernatants of the cancer cell lines is shown.

Fig. 49 depicts the spreading of the improved F-modified M-deficient Sendai viruses in tumors with low expression levels of MMP. Comparison of the number of syncytia per 0.3 cm² two days after infection is indicated. " Δ M" denotes SeV18+/ Δ M-GFP, "#2" denotes SeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP, "#6" denotes SeV/F(MMP#6) Δ M-GFP, "#6ct14" denotes SeV(TDK)/Fct14(MMP#6) Δ M-GFP, and "F/HN chimera" denotes SeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HN Δ M-GFP.

25 Best Mode for Carrying Out the Invention

Herein below, the present invention is specifically described using Examples; however, it is not to be construed as being limited thereto. All references cited herein are incorporated by reference herein as a part of this description.

30

35

10

15

1. Construction of SeV vectors with decreased or defective particle forming ability

[Example 1] Construction of a temperature-sensitive mutant SeV genome cDNA:

An SeV genome cDNA in which temperature-sensitive mutations were introduced in M gene was constructed. Fig. 1, which shows a scheme

that represents the construction of the cDNA, is described as follows. An F-deficient full-length Sendai viral genome cDNA containing the EGFP gene at the F deletion site (pSeV18+/ Δ F-GFP: Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070) was digested with Nael. The M gene-containing fragment (4922 bp) was separated using agarose electrophoresis. After cutting the band of interest out, the DNA was recovered by QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN, Bothell, WA) and subcloned into pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) at the EcoRV (pBlueNaeIfrg- Δ FGFP construction). site Introduction temperature-sensitive mutations into the M gene of pBlueNaeIfrg-\Delta FGFP was achieved using a QuikChange Mitagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA), according to the kit method. The three types of mutation introduced into the M gene were G69E, T116A and A183S, based on the sequence of the Cl.151 strain reported by Kondo et al. (Kondo, T. et al., J. Biol. Chem. 268, 21924-21930, 1993). The sequences of the synthetic oligonucleotides used to introduce the mutations were as follows:

G69E (5'-gaaacaaacaaccaatctagagagcgtatctgacttgac-3'/SEQ ID NO: 11, 5'-gtcaagtcagatacgctctctagattggttgtttgtttc-3'/SEQ ID NO: 12),

T116A (5'-attacggtgaggagggctgttcgagcaggag-3'/SEQ ID NO: 13, 5'-ctcctgctcgaacagccctcctcaccgtaat-3'/SEQ ID NO: 14) and A183S (5'-ggggcaatcaccatatccaagatcccaaagacc-3'/SEQ ID NO: 15, 5'-ggtctttgggatcttggatatggtgattgcccc-3'/SEQ ID NO: 16).

25

30

35

The plasmid pBlueNaeIfrg- Δ FGFP, whose M gene contains the three mutations, was digested with SalI and then partially digested with Apall. The fragment containing the entire M gene was then recovered (2644 bp). pSeV18+/ Δ F-GFP was digested with ApaLI/NheI, and the HN gene-containing fragment (6287 bp) was recovered. The two fragments were subcloned into Litmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) at the SalI/NheI site (LitmusSalI/NheIfrq-MtsΔFGFP construction). Temperature-sensitive mutations were introduced into the LitmusSalI/NheIfrq-Mts∆FGFP HN gene in the same way as for the introduction of mutations into the M gene, by using a QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit according to the kit method. The three mutations introduced into the HN gene were A262T, G264R and K461G, based on the sequence of ts271 strain reported by Thompson et al. (Thompson, S.D. et al., Virology 160, 1-8, 1987). The sequences of the synthetic oligonucleotides used to introduce the mutations were as follows:

A262T/G264R (5'-catgctctgtggtgacaacccggactaggggttatca-3'/SEQ ID NO: 17, 5'-tgataacccctagtccgggttgtcaccacagagcatg-3'/SEQ ID NO: 18), and

K461G (5'-cttgtctagaccaggaaatgaagagtgcaattggtacaata-3'/SEQ ID NO: 19,5'-tattgtaccaattgcactcttcatttcctggtctagacaag-3'/SEQ ID NO: 20).

10

15

20

25

30

35

While the mutations were introduced into the M and HN genes in separate vectors, it is also possible to introduce all of the mutations into both M and HN genes by using a plasmid (LitmusSall/NheIfrg- Δ FGFP) obtained by subcloning, at the Sall/NheI site of Litmus38, a fragment containing the M and HN genes (8931 bp), provided by digesting pSeV18+/ Δ F-GFP with Sall/NheI. Successive introduction of mutations resulted in the introduction of six temperature-sensitive mutations in total; three mutations in the M gene, and three mutations in the HN gene (LitmusSall/NheIfrg-MtsHNts Δ FGFP construction).

LitmusSalI/NheIfrg-MtsHNts Δ FGFP was digested with SalI/NheI and an 8931 bp fragment was recovered. Another fragment (8294 bp), lacking the M and HN genes and such, was recovered on digestion of pSeV18+/ Δ F-GFP with SalI/NheI. Both fragments were ligated together to construct the F-deficient full-length Sendai virus genome cDNA (pSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP) comprising the six temperature-sensitive mutations in the M and HN genes, and the EGFP gene at the site of the F deletion (Fig. 2).

Further, to quantify the expression level of genes in the plasmid, a cDNA containing the secretory alkaline phosphatase (SEAP) gene was also constructed. Specifically, NotI was used to cut out an SEAP fragment (1638 bp) comprising the termination signal-intervening sequence-initiation signal downstream of the SEAP gene (WO 00/70070). This fragment was recovered and purified following electrophoresis. inserted The fragment was then into pSeV18+/ Δ F-GFP pSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at their respective *Not*I sites. The resulting plasmids were named pSeV18+SEAP/ Δ F-GFP and pSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP, respectively (Fig. 2).

[Example 2] Reconstitution and amplification of virus introduced with temperature-sensitive mutations:

Viral reconstitution was performed according to the procedure reported by Li et al. (Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070). F protein helper cells, prepared using an inducible Cre/loxP expression system, were utilized to reconstitute F-deficient viruses. The system uses a pCALNdLw plasmid, designed for Cre DNA recombinase-mediated inducible gene product expression (Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1988). In this system, the inserted gene is expressed in a transformant carrying this plasmid using the method of Saito et al. to infect the transformant with a recombinant adenovirus (AxCANCre) expressing Cre DNA recombinase (Saito, I. et al., Nucleic Acids Res. 23, 3816-3821, 1995; Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1998). In the case of the SeV-F protein, the transformed cells comprising the F gene are herein referred to as LLC-MK2/F7, and cells persistently expressing the F protein after induction by AxCANCre are herein referred to as LLC-MK2/F7/A.

10

15

Reconstitution of the virus comprising 20 temperature-sensitive mutations was carried out as follows: LLC-MK2 cells were plated onto a 100-mm dish at 5x 106 cells/dish, and then cultured for 24 hours. T7 polymerase-expressing recombinant vaccinia virus, which had been treated with psoralen and long-wavelength ultraviolet light (365 nm) for 20 minutes (PLWUV-VacT7: Fuerst, T.R. 25 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986), was infected (MOI= 2) to these cells at room temperature for one hour. The cells were washed with serum-free MEM. Plasmids, pSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L and pGEM/F-HN (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996), were suspended in Opti-MEM (Gibco-BRL, Rockville, 30 MD) at amounts of 12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g and 4 μ g/dish, respectively. SuperFect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) corresponding to 1 µg DNA/5 µl was added and mixed. The resulting mixture was allowed to stand at room temperature for 15 minutes, and then added to 3 ml of Opti-MEM containing 3% FBS. This mixture was added to the cells. 35 After being cultured for five hours, the cells were washed twice with serum-free MEM, and cultured in MEM containing 40 μg/ml cytosine

 β -D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 μ g/ml trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD). After 24 hours of culture, cells persistently expressing the F protein (LLC-MK2/F7/A: Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070) were overlaid at 8.5x 10⁶ cells/dish. These cells were further cultured in MEM containing 40 µg/mL AraC and 7.5 µg/mL trypsin at 37°C for two days (P0). The cells were harvested and the pellet was suspended in 2 ml Opti-MEM per dish. Freeze-and-thaw treatment was repeated three times, and the lysate was directly transfected into LLC-MK2/F7/A. The cells were cultured in serum-free MEM containing 40 μg/mL AraC and 7.5 μg/mL trypsin at 32°C (P1). After five to seven days, part of the culture supernatant was infected into freshly prepared LLC-MK2/F7/A, and the cells were cultured in same serum-free MEM containing 40 µg/mL AraC and 7.5 µg/mL trypsin at 32°C (P2). After three to five days, freshly prepared LLC-MK2/F7/A were infected again, and the cells were cultured in serum-free MEM containing only 7.5 μ g/mL trypsin at 32°C for three to five days (P3). BSA was added to the recovered culture supernatant at a final concentration of 1%, and the mixture was stored at -80°C. The viral solution stored was thawed and used in subsequent experiments.

The titers of viral solutions prepared by this method were as follows: SeV18+/ Δ F-GFP, 3x 10⁸; SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, 7x 10⁷; SeV18+SEAP/ Δ F-GFP, 1.8x 10⁸; SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP, 8.9x 10⁷ GFP-CIU/mL (GFP-CIU has been defined in WO 00/70070). On the other hand, for vectors comprising GFP, CIU determined by direct detection of GFP is defined as GFP-CIU. GFP-CIU values are confirmed to be substantially identical to corresponding CIU values (WO 00/70070). In determining SeV18+/ Δ F-GFP and SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP titers, the post-infection spread of plaques of cells persistently expressing F protein (LLC-MK2/F7/A) was observed at 32°C and 37°C. Fig. 3 shows photographs of patterns observed six days after infection. SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP plaques spread to some extent at 32°C, but were greatly reduced at 37°C. This suggests that virion formation is reduced at 37°C.

30

.10

20

25

reconstitution:

10

15

20

25

30

35

In the experimental reconstitution of viruses in which temperature-sensitive mutations were introduced (Example 2), P1 and all subsequent cultures were carried out at 32°C. This temperature was used because the reference virus, used for assessing the introduction of temperature-sensitive mutations, grows well at 32°C (Kondo, T. et al., J. Biol. Chem. 268, 21924-21930, 1993; Thompson, S.D. et al., Virology 160, 1-8, 1987). Close examination of the experimental conditions revealed that, for SeV reconstitution (and for other viruses in addition to those in which temperature-sensitive mutations had been introduced), reconstitution efficiency was improved by carrying out P1 and subsequent cultures at 32°C, giving a high possibility of recovering viruses that were previously difficult to obtain.

There are thought to be two reasons for enhanced reconstitution efficiency at 32°C. The first point is that, when cultured at 32°C as opposed to 37°C, cytotoxicity due to AraC, which is supplemented to inhibit vaccinia virus amplification, is thought to be suppressed. Under conditions for viral reconstitution, culturing LLC-MK2/F7/A cells at 37°C, in serum-free MEM containing 40 µg/ml AraC and 7.5 μq/ml trypsin, caused cell damage after three to four days, including an increase in detached cells. However, cultures at 32°C could be sufficiently continued for seven to ten days with cells still intact. When reconstituting SeV with inefficient transcription and/or replication, or with inefficient formation of infectious virions, success is thought to be a direct reflection of culture duration. The second point is that F protein expression is maintained in LLC-MK2/F7/A cells when the cells are cultured at 32°C. culturing LLC-MK2/F7/A cells that continuously express F protein to confluency on 6-well culture plates in MEM containing 10% FBS and at 37°C, the medium was replaced with a serum-free MEM containing 7.5 μ g/ml trypsin, and the cells were further cultured at 32°C or 37°C. Cells were recovered over time using a cell scraper, and Western blotting using an anti-F protein antibody (mouse monoclonal) was used to semi-quantitatively analyze intra-cellular F protein. F protein expression was maintained for two days at 37°C, and then decreased.

However, at 32°C expression was maintained for at least eight days (Fig. 4). These results confirm the validity of viral reconstitution at 32°C (after P1 stage).

The above-described Western blotting was carried out using the following method: Cells recovered from one well of a 6-well plate were stored at -80°C, then thawed in 100 μl of 1x diluted sample buffer for SDS-PAGE (Red Loading Buffer Pack; New England Biolabs, Beverly, MA). Samples were then heated at 98°C for ten minutes, centrifuged, and a 10-µl aliquot of the supernatant was loaded on to SDS-PAGE gel 10 (multigel 10/20; Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo, Japan). After electrophoresis at 15 mA for 2.5 hours, proteins were transferred onto a PVDF membrane (Immobilon PVDF transfer membrane; Millipore, Bedford, MA) using semi-dry method at 100 mA for one hour. The transfer membrane was immersed in a blocking solution (Block Ace: Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Sapporo, Japan) at 4°C for one hour or more, soaked in a primary antibody solution containing 10% Block Ace supplemented with 1/1000 volume of the anti-F protein antibody, and then allowed to stand at 4°C overnight. After washing three times with TBS containing 0.05% Tween 20 (TBST), and a further three times with TBS, the membrane was immersed in a secondary antibody solution 20 containing 10% Block Ace supplemented with 1/5000 volume of the anti-mouse IgG + IgM antibody bound with HRP (Goat F(ab') 2 Anti-Mouse IgG + IgM, HRP; BioSource Int., Camarillo, CA). Samples were then stirred at room temperature for one hour. The membrane was washed three times with TBST, and three times with TBS. The proteins on the membrane were then detected using the chemiluminescence method (ECL western blotting detection reagents; Amersham Pharmacia biotech, Uppsala, Sweden).

30 · [Example 4] Quantification of secondarily released particles from viruses having temperature sensitive mutations introduced therein (HA assay, Western Blotting):

25

35

Levels of secondarily released particles were compared, together with SeV18+/ Δ F-GFP and SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, using the autonomously replicating type SeV that comprises all of the viral proteins and the GFP fragment (780 bp), which comprises the termination signal-intervening sequence-initiation signal downstream of the GFP gene at the NotI site (SeV18+GFP: Fig. 2).

LLC-MK2 cells were grown to confluency on 6-well plates. To these cells were added 3x 10⁷ CIU/ml of each virus solution at 100 µl per well (MOI= 3), and the cells were infected for one hour. After washing the cells with MEM, serum-free MEM (1 ml) was added to each well, and the cells were cultured at 32°C, 37°C and 38°C, respectively. Sampling was carried out every day, and immediately after sampling, 1 ml of fresh serum-free MEM was added to the remaining cells. Culturing and sampling were performed over time. Three days after infection, observation of GFP expression under a fluorescence microscope indicated that infection levels were almost equal for the three types of virus for all temperature conditions (32°C, 37°C and 38°C), and that GFP expression was similar (Fig. 5).

10

15

25

Secondarily released particles were quantified using an assay for hemagglutination activity (HA activity) according to the method of Kato et al. (Kato, A., et al., Genes Cell 1, 569-579, 1996). Specifically, round-bottomed 96 well-plates were used for serial dilution of the viral solution with PBS. Serial two-fold 50 µl dilutions were carried out in each well. 50 μl of preserved chicken blood (Cosmo Bio, Tokyo, Japan), diluted to 1% with PBS, was added to 50 μ l of the viral solution, and the mixture was allowed to stand at 4°C for one hour. Erythrocyte agglutination was then examined. The highest virus dilution rate among the agglutinated samples was judged to be the HA activity. In addition, one hemagglutination unit (HAU) was calculated to be 1x 10⁶ viruses, and expressed as a number The secondarily released particles of of viruses (Fig. 6). SeV18+/MtsHNtsΔF-GFP remarkably decreased, and at 37°C, was judged to be about 1/10 of the level of SeV18+/ Δ F-GFP. SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP viral particle formation was also reduced at 32°C, and although only a few particles were produced, a certain degree of production was still thought possible.

Western blotting was used to quantify the secondarily released particles. In a manner similar to that described above, LLC-MK2 cells were infected at MOI= 3 with the virus, and the culture supernatant and cells were recovered two days after infection. The culture

supernatant was centrifuged at 48,000 xg for 45 minutes to recover the viral proteins. After SDS-PAGE, Western blotting was performed to detect these proteins using an anti-M protein antibody. This anti-M protein antibody is a newly prepared polyclonal antibody, prepared from the serum of rabbits immunized with a mixture of three synthetic peptides: corresponding to amino acids 1-13 (MADIYRFPKFSYE+Cys/SEQ ID NO: 21), 23-35 (LRTGPDKKAIPH+Cys/SEQ ID NO: 22), and 336-348 (Cys+NVVAKNIGRIRKL/SEQ ID NO: 23) of the SeV M protein. Western blotting was performed according to the method described in Example 3, in which the primary antibody, anti-M protein antibody, was used at a 1/4000 dilution, and the secondary antibody, anti-rabbit IgG antibody bound with HRP (Anti-rabbit IgG (Goat) H+L conj.; ICN P., Aurola, OH), was used at a 1/5000 dilution. In the case of SeV18+/MtsHNtsΔF-GFP infected cells, M proteins were widely expressed to a similar degree, but expression of viral proteins was reduced (Fig. 7). Western blotting also confirmed a decrease in secondarily released viral particles.

10

15

25

30

35

[Example 5] The expression level of genes comprised by the virus induced by temperature-sensitive mutations (SEAP assay):

SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP secondary particle release was reduced. However, such a modification would be meaningless in a gene expression vector if accompanied with a simultaneous decrease in comprised gene expression. Thus, the gene expression level was evaluated. LLC-MK2 cells were infected with SeV18+SEAP/∆F-GFP SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 3, and culture supernatant was collected over time (12, 18, 24, 50 and 120 hours after infection). SEAP activity in the supernatant was assayed using a Reporter Assay Kit-SEAP (TOYOBO, Osaka, Japan) according to the kit method. SEAP activity was comparable for both types (Fig. 8). The same samples were also assayed for hemagglutination activity (HA activity). The HA activity of SeV18+SEAP/MtsHNts∆F-GFP was reduced to about one tenth (Fig. 9). Viral proteins were harvested from viruses in the samples by centrifugation at 48,000 xg for 45 minutes, semi-quantitatively analyzed by Western blotting using an anti-M antibody. The level of viral protein in the supernatant was also reduced (Fig. 10). These findings indicate that the introduction of temperature-sensitive mutations reduces the level of secondary particle release to about 1/10, with virtually no reduction in the expression of comprised genes.

5

10

20

25

30

35

[Example 6] Cytotoxicity of viruses having temperature-sensitive mutations introduced therein (LDH assay):

SeV infection is often cytotoxic. The influence of introduced mutations was thus examined from this respect. LLC-MK2, BEAS-2B and CV-1 cells were each plated on a 96-well plate at 2.5x 10⁴ cells/well (100 μ L/well), and then cultured. LLC-MK2 and CV-1 were cultured in MEM containing 10% FBS, and BEAS-2B was cultured in a 1:1 mixed medium of D-MEM and RPMI (Gibco-BRL, Rockville, MD) containing 10% FBS. After 24 hours of culture, virus infection was carried out by adding 5 uL/well of a solution of SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP diluted with MEM containing 1% BSA. After six hours, the medium containing the viral solution was removed, and replaced with the corresponding fresh medium, with or without 10% FBS. The culture supernatant was sampled three days after infection when FBS-free medium was used, or six days after infection when medium containing FBS was used. Cytotoxicity was analyzed using a Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the kit instructions. Neither of the viral vectors was cytotoxic in LLC-MK2. Further, SeV18+/MtsHNts∆F-GFP cytotoxicity was assessed as being comparable to or lower than that of SeV18+/ Δ F-GFP in CV-1 and BEAS-2B (Fig. 11). Thus, it was concluded that cytotoxicity was not induced by suppressing secondary particle release through the introduction of temperature-sensitive mutations.

[Example 7] Study of the mechanism of secondary particle release suppression:

In order to elucidate the part of the mechanism underlying the suppression of secondary particle release associated with the introduction of temperature-sensitive mutations, subcellular localization of the M protein was examined. LLC-MK2 cells were infected with each type of SeV (SeV18+GFP, SeV18+/ Δ F-GFP, SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP), and cultured at 32°C, 37°C or 38°C for two

days. The cells were immunostained by using an anti-M antibody. Immunostaining was performed as follows: The cultured cells were washed once with PBS, methanol cooled to -20°C was added, and the cells were fixed at 4°C for 15 minutes. After washing the cells three times with PBS, blocking was carried out at room temperature for one hour using PBS solution containing 2% goat serum and 0.1% Triton. After washing with PBS a further three times, the cells were reacted with a primary antibody solution (10 μg/mL anti-M antibody) containing 2% goat serum at 37°C for 30 minutes. After washing three times with PBS, the cells were reacted with a secondary antibody solution (10 10 μg/mL Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L) conjugate: Molecular Probes, Eugene, OR) containing 2% goat serum at 37°C for 15 minutes. Finally, after a further three washes with PBS, the cells were observed under a fluorescence microscope. In the case of the self-replicating SeV18+GFP comprising both F and HN proteins, condensed M protein was detectable on cell surfaces at all of the temperatures tested (Fig. Such M protein condensation has been previously reported (Yoshida, T. et al., Virology 71, 143-161, 1976), and is presumed to reflect the site of virion formation. Specifically, in the case 20 of SeV18+GFP, cell-surface M protein localization appeared to be normal at all temperatures, suggesting that a sufficient amount of virions were formed. On the other hand, in the case of SeV18+/ Δ F-GFP, M protein condensation was drastically reduced at 38°C. M protein is believed to localize on cell surfaces, binding to both F and HN 25 protein cytoplasmic tails (Sanderson, C.M. et al., J. Virology 68, 69-76, 1994; Ali, A. et al., Virology 276, 289-303, 2000). Since one of these two proteins, namely the F protein, is deleted in SeV18+/ Δ F-GFP, F protein deficiency is presumed to have an impact on M protein localization. This impact was expected to be stronger for SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, and it was also expected that, even at 37°C, 30 M protein localization would be disturbed and the number of particles in the secondary release would be reduced.

[Example 8] Study of the suppression mechanism of secondary particle release (2):

35

In order to study the SeV protein's subcellular localization

in more detail, analyses were carried out using a confocal laser microscope (MRC1024; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). A-10 cells (rat myoblasts) were infected with each of SeV18+SEAP/ΔF-GFP and SeV18+SEAP/MtsHNts∆F-GFP (MOI= 1), and then cultured in MEM containing 10% serum at 32°C or 37°C. One or two days later, the cells were immunostained using anti-M antibody and anti-HN antibody. Immunostaining was performed as follows: The infected culture cells were washed once with PBS. Methanol cooled to -20°C was added to the ' cells, and the cells were fixed at 4°C for 15 minutes. The cells were washed three times with PBS, and blocking was then carried out for one hour at room temperature, using a PBS solution containing 2% goat serum, 1% BSA and 0.1% Triton. The cells were reacted with an M primary antibody solution (10 µg/mL anti-M antibody) containing 2% goat serum at 37°C for 30 minutes. The cells were then reacted with an HN primary antibody solution (1 μ g/mL anti-HN antibody (IL4-1)) at 37°C for 30 minutes. After washing three times with PBS, the cells were reacted with a secondary antibody solution (10 μg/mL Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG(H+L) conjugate and 10 µg/mL Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG(H+L) conjugate: Molecular Probes, Eugene, containing 2% goat serum at 37°C for 15 minutes. The cells were washed three times with PBS and the nuclei were stained with TO PRO3 (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted 4000 times. The cells were allowed to stand at room temperature for 15 minutes. Finally, to prevent quenching, a Slow Fade Antifade Kit solution (Molecular Probes, Eugene, OR) was substituted for the liquid, and the cells were observed under a confocal laser microscope. Fig. 13 shows the results one day after infection. Red represents M protein localization; green, HN protein localization; and yellow, co-localization of the two. Far red has been subjected to color conversion, and thus blue represents the nucleus. In the case of SeV18+SEAP/ Δ F-GFP, each protein's localization pattern did not differ largely between 32°C and 37°C, and cell-surface localization of the M and HN proteins was observed. other hand, localization of each protein SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP was different at both temperatures from that for SeV18+SEAP/ΔF-GFP. Specifically, hardly any M protein was localized on the cell surface. In particular, at 37°C, the M and HN

10

20

30

35

proteins were almost completely separated, such that the M protein was localized at sites presumed to be close to the centrosome of microtubules (i.e., near the Golgi body). A similar result was obtained for cells cultured two days after infection. Particularly in SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP-infected cells, subcellular M protein localization did not change between one day and two days after infection (Fig. 14), and protein transport appeared to have stopped. This result also showed that the reduced secondary particle release by viruses having temperature-sensitive mutations introduced therein was caused by a deficiency in localization of the M protein, which is expected to play a central role in particle formation.

When the cells were cultured at 32°C after infection with SeV18+SEAP/MtsHNtsΔF-GFP, the M protein stained in a morphology similar to that of a microtubule (Fig. 13). To show the involvement of microtubules, a reagent that enhances microtubule depolymerization was added, and changes in M protein (and the HN protein) localization then studied. A-10 cells infected were were SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 1, and a depolymerization reagent, colchicine (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) or colcemid (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan), was immediately added at a final concentration of 1 mM. The cells were then cultured at 32°C. Two days after infection, the subcellular localizations of the M and HN proteins were observed by the same method as described above. In the absence of the depolymerization reagent, M protein distribution was similar in morphology to a microtubule (Fig. 13). However, addition of the depolymerization reagent resulted in disruption of this structure, and the M protein was detected as a large fibrous structure (Fig. 15). This structure may be an aggregate of the M protein by itself, or M protein bound to the residues of depolymerized microtubules. In either case, as seen in Fig. 13, it was plausibly judged that the M protein was localized on microtubules in cells cultured at 32°C after infection with SeV18+SEAP/MtsHNts∆F-GFP.

20

25

30

35

In order to clarify whether or not the above-mentioned localization of the M protein in microtubules was characteristic of temperature-sensitive viruses, the post-infection influence of the microtubule depolymerization reagent (colchicine) on changes to M

protein(and HN protein) localization was evaluated for both viruses SeV18+/ Δ F-GFP and SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP. A-10 cells were infected with SeV18+/ Δ F-GFP or SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP at MOI= 1, and the depolymerization reagent colchicine was immediately added at a final concentration of 1 μ M. The cells were cultured at 32°C or 37°C. Two days after infection, the subcellular localization of the M protein (and the HN protein) was observed using the same method as described above. The results are shown in Fig. 16. Infected cells exhibited similar features for both viruses. Specifically, when the cells were cultured at 32°C after infection, the M protein was observed as a large fibrous structure, similar to that in Fig. 15. The M protein's coexistence with microtubules was also suggested for SeV18+/ Δ F-GFP. In particular, in cells infected with SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP and cultured at 37°C, the M protein was observed to be localized in areas supposed to be near the Golgi body.

15

25

30

35

Based on the above results, the following can be inferred: the M protein is synthesized near the Golgi body; it is transported around the cell along microtubules (for example, bound to a motor protein such as kinesin), mainly bound to the cytoplasmic tails of the F and HN proteins (Sanderson, C.M. et al., J. Virology 68, 69-76, 1994; Ali, A. et al., Virology 276, 289-303, 2000); and the M protein is localized on the cell surface, followed by particle formation. In viruses comprising a temperature-sensitive mutation, everything up to the point of intracellular transport along microtubules may be normal at 32°C. However, translocation from microtubules to the cell surface may be hindered, resulting in localization along microtubules. At 37°C, it can be presumed that even intracellular transport along microtubules may be hindered, and thus, localization in the vicinity of the Golgi body is observed. M protein synthesis is supposed to take place near the Golgi body. However, it is possible that M protein aggregation is observed at these sites, and that the area of synthesis itself is elsewhere. However, it has been reported that tubulin, a microtubule component, activates and is involved in SeV transcription and replication (Moyer, S.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5405-5409, 1986; Ogino, T. et al., J. Biol. Chem. 274, 35999-36008, 1999). Moreover, as the Golgi body is located near the centrosome, where tubulin is predicted to exist in abundance, the Golgi body can be synthesized close to the microtubule central body (i.e., near the Golgi body). In addition, although the SeV mutant strain, F1-R, comprises a mutation in its M gene, it modifies microtubules after infecting cells, and this modification may enable particle formation independent of F1-R strain cell polarity (Tashiro, M. et al., J. Virol. 67, 5902-5910, 1993). In other words, the results obtained in the present Example may also be interpreted by assuming the intracellular transport of the M protein along tubulin. In this supposed mechanism, introduction of temperature-sensitive mutations to the M and HN genes may result in deficient subcellular M protein localization, resulting in a reduction in secondary particle release.

[Example 9] Construction of the genomic cDNA of an M gene-deficient SeV comprising the EGFP gene:

15

20

25

30

35

Construction of cDNA used the full-length genomic cDNA of an M-deficient SeV, which is M gene-deficient (pSeV18+/ΔM: WO 00/09700). The construction scheme is shown in Fig. 17. The BstEII fragment (2098) bp) comprising the M-deficient site of pSeV18+/ Δ M was subcloned to the BstEII site of pSE280 (pSE-BstEIIfrg construction). The EcoRV recognition site at this pSE280 site had been deleted by previous digestion with SalI/XhoI followed by ligation (Invitrogen, Groningen, Netherlands). pEGFP comprising the GFP gene (TOYOBO, Osaka, Japan) was digested using Acc65I and EcoRI, and the 5'-end of the digest was blunted by filling in using a DNA blunting Kit (Takara, Kyoto, The blunted fragment was then subcloned into the pSE-BstEIIfrg, which had been digested with EcoRV and treated with BAP (TOYOBO, Osaka, Japan). This BstEII fragment, comprising the EGFP gene, was returned to the original pSeV18+/ Δ M to construct the M gene-deficient SeV genomic cDNA (pSeV18+/ Δ M-GFP), comprising the EGFP gene at the M-deficient site.

[Example 10] Construction of the genomic cDNA of an M gene- and replication ability-deficient SeV:

The genomic cDNA of an M - and F gene-deficient SeV was constructed. The construction scheme described below is shown in Fig. 18. The M $\,$

gene was deleted using pBlueNaeIfrg- Δ FGFP, which was constructed by subcloning a NaeI fragment (4922 bp) of the F-deficient Sendai virus full-length genomic cDNA comprising the EGFP gene at the F gene-deficient site (pSeV18+/ Δ F-GFP: Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070), to the EcoRV site of pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA). Deletion was designed so as to excise the M gene using the ApaLI site directly behind it. That is, the ApaLI recognition site was inserted right behind the P gene, so that the fragment to be excised became 6n. Mutagenesis was performed using the QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the kit method. The synthetic oligonucleotide sequences used for the mutagenesis were as follows:

5'-agagtcactgaccaactagatcgtgcacgaggcatcctaccatcctca-3'/ SEQ ID NO: 24 and

5'-tgaggatggtaggatgcctcgtgcacgatctagttggtcagtgactct-3'/SEQ ID NO: 25.

10

20

After mutagenesis, the resulting mutant cDNA was partially digested using ApaLI (at 37°C for five minutes), recovered using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Bothell, WA), and then ligated as it was. The DNA was again recovered using the QIAquick PCR Purification Kit, digested with BsmI and StuI, and used to transform DH5 α to prepare the M gene-deficient (and F gene-deficient) DNA (pBlueNaeIfrg- Δ M Δ FGFP).

pBlueNaeIfrg-ΔMΔFGFP deficient in the M gene (and the F gene) was digested with SalI and ApaLI to recover the 1480 bp fragment 25 comprising the M gene-deficient site. pSeV18+/ Δ F-GFP was digested with ApaLI/NheI to recover the HN gene-comprising fragment (6287 bp), and these two fragments were subcloned into the Sall/NheI site of 38 Litmus (New England Biolabs, Beverly, (LitmusSalI/NheIfrg-ΔMΔFGFP construction). The 7767 bp fragment recovered by digesting LitmusSall/NheIfrg- Δ M Δ FGFP with Sall/NheI was ligated to another fragment (8294 bp) obtained by digesting pSeV18+/ Δ F-GFP with SalI/NheI, that did not comprise genes such as the M and HN genes. In this way an M- and F-deficient Sendai virus 35 full-length genome cDNA comprising the EGFP gene at the deficient (pSeV18+/ Δ M Δ F-GFP) was constructed. Structures of the M-deficient (and the M- and F-deficient) viruses thus constructed are shown in Fig. 19. This genomic cDNA is useful for constructing M- and F-deficient SeV comprising the desired, modified F protein.

[Example 11] Preparation of helper cells expressing SeV-M proteins To prepare helper cells expressing M proteins, the Cre/loxP expression induction system was used. For constructing this system, plasmid, pCALNdLw, which is designed to induce the expression of gene products using the Cre DNA recombinase, was used (Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1988). This system was also employed for the preparation of helper cells (LLC-MK2/F7 cells) for the F protein (Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070).

<1> Construction of M gene-expressing plasmids:

To prepare helper cells which induce the expression of the F and M proteins, the above-described LLC-MK2/F7 cells were used to transfer the M gene to these cells using the above-mentioned system. Since the pCALNdLw/F used in the transfer of the F gene contained the neomycin resistance gene, it was essential to insert a different drug resistance gene to enable use of the same cells. Therefore, according to the scheme described in Fig. 20, the neomycin resistance gene of the M gene-comprising plasmid (pCALNdLw/M: the M gene was inserted at the SwaI site of pCALNdLw) was replaced with the hygromycin resistance gene. That is, after pCALNdLw/M was digested with HincII and EcoT22I, an M gene-comprising fragment (4737 bp) was isolated by electrophoresis on agarose and the corresponding band was excised and recovered using the QIAEXII Gel Extraction System. At the same time, pCALNdLw/M was digested with XhoI to recover a fragment that did not comprise the neomycin resistance gene (5941 bp) and then further digested with HincII to recover a 1779 bp fragment. The hygromycin 30 resistance gene was prepared by performing PCR using pcDNA3.1hygro(+) (Invitrogen, Groningen, Netherlands) as the template and the following pair of primers:

hygro-5'

10

15

20

25

(5'-tctcqaqtcqctcqqtacqatqaaaaagcctgaactcaccqcqacqtctqtcqaq-3'/ 35 SEO ID NO: 26) and

hygro-34

5

10

15

30

35

below.

(5'-aatgcatgatcagtaaattacaatgaacatcgaaccccagagtcccgcctattcctttgccctcggacgagtgctggggcgtc-3')/SEQ ID NO: 27).

The PCR product was recovered using the QIAquick PCR Purification Kit, and then digested using XhoI and EcoT22I. pCALNdLw-hygroM was constructed by ligating these three fragments.

<2> Cloning of helper cells which induce the expression of SeV-Moreover and SeV-F proteins:

Transfection was performed using the Superfect Transfection Reagent by the method described in the Reagent's protocol. Specifically, the following steps were performed: LLC-MK2/F7 cells were plated on 60 mm diameter Petri dishes at 5x 10⁵ cells/dish, and cultured in D-MEM containing 10% FBS for 24 hours. pCALNdLw-hygroM (5 µg) was diluted in D-MEM containing neither FBS nor antibiotics (150 μ l in total). This mixture was stirred, 30 μ l of the Superfect Transfection Reagent was added, and the mixture was stirred again. After standing at room temperature for ten minutes, D-MEM containing 10% FBS (1 ml) was added. The transfection mixture thus prepared was stirred, and added to LLC-MK2/F7 cells which had been washed once with PBS. After three hours of culture in an incubator at 37°C and in 5% CO2 atmosphere, the transfection mixture was removed, and the cells were washed three times with PBS. D-MEM containing 10% FBS (5 ml) was added to the cells, which were then cultured for 24 hours. After culture, the cells were detached using trypsin, plated onto a 96-well plate at a dilution of about 5 cells/well, and cultured in D-MEM containing 10% FBS supplemented with 150 µg/ml hygromycin (Gibco-BRL, Rockville, MD) for about two weeks. Clones propagated from a single cell were cultured to expand to a 6-well plate culture. A total of 130 clones were thus prepared, and were analyzed as detailed

<3> Analysis of helper cell clones which induce the expression
of SeV-M (and SeV-F) protein(s):

Western blotting was used to semi-quantitatively analyze M protein expression in the 130 clones obtained as detailed above. Each

clone was plated onto a 6-well plate, and, when in a state of near confluence, infected at MOI= 5 with a recombinant adenovirus expressing Cre DNA recombinase (AxCANCre) diluted in MEM containing 5% FBS, according to the method of Saito et al. (Saito, I. et al., Nucleic Acids Res. 23, 3816-3821, 1995; Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1998). After culturing at 32°C for two days, the culture supernatant was removed. The cells were washed once with PBS, and recovered by detachment using a cell scraper. SDS-PAGE was performed by applying 1/10 of the cells thus recovered per lane, and then Western blotting was carried out using anti-M protein antibody, according to the method described in Examples 3 and 4. Of the 130 clones, those showing relatively high M protein expression levels were also analyzed by Western blotting using the anti-F protein antibody (f236: Segawa, H. et al., J. Biochem. 123, 1064-1072, 1998). Both results are described in Fig. 21.

[Example 12] Evaluation of helper cells inducing the expression of SeV-M proteins:

15

Using the helper cells inducing the expression of SeV-M proteins 20 cloned in Example 11, virus reconstitution of M-deficient SeV $(SeV18+/\Delta M-GFP)$ was carried out to evaluate virus-producing ability of these cell clones. P0 lysate of SeV18+/ Δ M-GFP was added to each clone, and whether or not GFP protein spread was observed (whether or not the trans-supply of M protein was achieved) was examined. 'P0 lysate was prepared as follows. LLC-MK2 cells were plated on 100-mm 25 diameter Petri dishes at 5x 10⁶ cells/dish, cultured for 24 hours, and then infected at MOI= 2 with PLWUV-VacT7 at room temperature for Plasmids pSeV18+/ Δ M-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, pGEM/F-HN and pGEM/M were suspended in Opti-MEM at weight ratios of 30 12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 4 μ g and 4 μ g/dish, respectively. To these suspensions, the equivalent of 1 µg DNA/5 µl of SuperFect transfection reagent was added and mixed. The mixture was allowed to stand at room temperature for 15 minutes, and finally added to 3 ml of Opti-MEM containing 3% FBS. This mixture was added to the cells, which were then cultured. After culturing for five hours, the cells were washed 35 twice with serum-free MEM, and cultured in MEM containing 40 µg/ml

AraC and 7.5 µg/ml trypsin. After 24 hours of culture, LLC-MK2/F7/A cells were layered at 8.5x 10⁶ cells/dish, and further cultured in MEM containing 40 μg/ml AraC and 7.5 μg/ml trypsin at 37°C for two days (P0). These cells were recovered, the pellet was suspended in 2 ml/dish Opti-MEM, and PO lysate was prepared by repeating three cycles of freezing and thawing. At the same time, ten different clones were plated on 24-well plates. When nearly confluent, they were infected with AxCANCre at MOI = 5, and cultured at 32°C for two days. These cells were transfected with PO lysate of SeV18+/\DeltaM-GFP at 200 μl/well, and cultured using serum-free MEM containing 40 μg/ml AraC and 7.5 μ g/ml trypsin at 32°C. GFP protein spread due to SeV18+/ Δ M-GFP was observed in clones #18 and #62 (Fig. 36). This spread was especially rapid in clone #62, which was used in subsequent experiments. Hereafter, these cells prior to induction with AxCANCre are referred to as LLC-MK2/F7/M62. After induction, cells which continuously express F and M proteins are referred to as LLC-MK2/F7/M62/A. SeV18+/ Δ M-GFP cells Preparation of was continued LLC-MK2/F7/M62/A cells. Six days after P2 infection, 9.5x 107 GFP-CIU viruses were prepared. Five days after P4 infection, 3.7x 107 GFP-CIU viruses were prepared.

15

20

25

30

35

As indicated in Example 3, it was presumed that culturing at 32°C or such after the P1 stage is significantly important for recovery of the SeV18+/ Δ M-GFP virus. In SeV18+/ Δ M-GFP, in trans supply of M protein from expression cells (LLC-MK2/F7/M62/A) is thought to be a cause; however, spread of infection was extremely slow and was finally observed seven days after P1 infection (Fig. 22). Thus, as in the viral reconstitution experiments, "culturing at 32°C after the P1 stage" is supported as being very effective in reconstituting SeV having inefficient transcription-replication or poor ability to form infectious virions.

[Example 13] Investigation of virus producing conditions using helper cells inducing the expression of SeV-M proteins:

The productivity of the above-described virus was also investigated. LLC-MK2/F7/M62/A cells were plated on 6-well plates and cultured at 37°C. When the cells were nearly confluent, they were

shifted to 32°C. One day later, these cells were infected at MOI= 0.5 with SeV18+/ΔM-GFP. The culture supernatant was recovered over time, and replaced with fresh medium. Supernatants thus recovered were assayed for CIU and HAU. Most viruses were recovered four to six days after infection (Fig. 23). HAU was maintained for six or more days after infection, however cytotoxicity was strongly exhibited at this point, indicating the cause was not HA protein originating in viral particles, but rather the activity of HA protein free or bound to cell debris. Therefore for virus collection, the culture supernatant is preferably recovered by the fifth day after infection.

[Example 14] Structural confirmation of the M gene-deficient SeV: SeV18+/ Δ M-GFP's viral genes were confirmed by RT-PCR, and the viral proteins by Western blotting. In RT-PCR, the P2 stage virus six days after infection was used. QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Bothell, WA) was used in the recovery of RNA from the viral solution. Thermoscript RT-PCR System (Gibco-BRL, Rockville, MD) was used to prepare the cDNA. Both systems were performed using kit protocol methods. The random hexamer supplied with the kit was used as the primer for cDNA preparation. To confirm that the product was formed starting from RNA, RT-PCR was performed in the presence or absence of reverse transcriptase. PCR was performed with the above-prepared cDNA as the template, using two pairs of primers: one combination of F3593 (5'-ccaatctaccatcagcatcagc-3'/SEQ ID NO: 28) on the P gene and R4993 (5'-ttcccttcatcgactatgacc-3'/SEQ ID NO: 29) on the F gene, and another combination of F3208 (5'-agagaacaagactaaggctacc-3'/SEO ID NO: 30) on the P gene and R4993. As expected from the gene structure of SeV18+/ Δ M-GFP, amplifications of 1073 bp and 1458 bp DNAs were observed from the former and latter combinations respectively (Fig. 24). When reverse transcriptase was omitted (RT-), gene amplification did not occur. When the M gene was inserted instead of the GFP gene (pSeV18+GFP), 1400 bp and 1785 bp DNAs were amplified respectively. These DNAs are clearly different in size from those described above, supporting the fact that this virus is M gene-deficient in structure.

20

25

30

35

Protein confirmation was performed using Western blotting. LLC-MK2 cells were infected at MOI= 3 with SeV18+/ Δ M-GFP (shown as

 ΔM in Figures), SeV18+/ ΔF -GFP (shown as ΔF in Figures), and SeV18+GFP (shown as 18+ in Figures), respectively, and the culture supernatant and cells were recovered three days after infection. The culture supernatant was centrifuged at 48,000 xg for 45 minutes to recover viral proteins. After SDS-PAGE, Western blotting was performed to detect proteins using anti-Mprotein antibody, anti-Fprotein antibody, and DN-1 antibody (rabbit polyclonal) which mainly detects NP protein, according to the method described in Examples 3 and 4. In cells infected with SeV18+/ Δ M-GFP, the M protein was not detected while the F and/or NP proteins were observed. Therefore, this virus was also confirmed to have the SeV18+/ Δ M-GFP structure from the point of view of proteins (Fig. 25). The F protein was not observed in cells infected with SeV18+/ Δ F-GFP, while all viral proteins examined were detected in cells infected with SeV18+GFP. In addition, very little NP protein was observed in the culture supernatant in the case of infection with SeV18+/ Δ M-GFP, indicating that there were no or very few secondarily released particles.

10

15

20

25

35

[Example 15] Quantitative analysis concerning the presence or absence of secondarily released particles of M gene-deficient SeV:

As described in Example 14, LLK-MK2 cells were infected with SeV18+/ Δ M-GFP at MOI= 3, the culture supernatant was recovered three days after infection, filtered through an 0.45 μ m pore diameter filter, and then centrifuged at 48,000 xg for 45 minutes to recover viral proteins. Western blotting was then used to semi-quantitatively detect viral proteins in the culture supernatant. Samples similarly prepared from cells infected with SeV18+/ Δ F-GFP were used as the control. Serial dilutions of respective samples were prepared and subjected to Western blotting to detect proteins using the DN-1 antibody (primarily recognizing NP protein). The viral protein level in the culture supernatant of cells infected with SeV18+/ Δ M-GFP was estimated to be about 1/100 that of cells infected with SeV18+/ Δ F-GFP (Fig. 26). Sample HA activities were 64 HAU for SeV18+/ Δ F-GFP, compared to less than 2 HAU for SeV18+/ Δ M-GFP.

Time courses were examined for the same experiments. That is, LLC-MK2 cells were infected at MOI= 3 with SeV18+/ ΔM -GFP, and the

culture supernatant was recovered over time (every day) to measure HA activity (Fig. 27). Four days or more after infection, slight HA activity was detected. However, measurements of LDH activity, an indicator of cytotoxicity, revealed clear cytotoxicity four or more days after infection in the SeV18+/ Δ M-GFP-infected cells (Fig. 28). This indicated the strong possibility that elevated HA activity was not due to VLPs, but to the activity of HA protein bound to or free from cell debris. Furthermore, the culture supernatant obtained five days after infection was examined using Dosper Liposomal Transfection Reagent, a cationic liposome (Roche, Basel, Switzerland). The culture supernatant (100 μ l) was mixed with Dosper (12.5 μ l), allowed to stand at room temperature for ten minutes, and then transfected to LLC-MK2 cells cultured to confluency on 6-well plates. Inspection under a fluorescence microscope two days after transfection revealed that many GFP-positive cells were observed in the supernatant of cells infected with SeV18+/ Δ F-GFP which contained secondarily released particles, while very few or almost no GFP-positive cells were observed in the supernatant of cells infected with SeV18+/ Δ M-GFP (Fig. 29). From the above results, the secondary release of particles was concluded to be almost completely suppressed by an M protein deficiency.

15

20

25

30

35

2. Construction of the SeV vector with decreased or defective particle forming ability due to modified protease-dependent tropism '

Utilizing the reconstitution system for the M-defective SeV constructed above, SeV in which the cleavage site of the F protein is modified, as shown below, was constructed.

[Example 16] Construction of an M-deficient SeV genomic cDNA with modified F protein activation site:

An M-deficient SeV genomic cDNA inserted with a recognition sequence for a protease highly expressed in cancer cells at the F1/F2 cleavage site (activation site) of the F protein was constructed. Various sequences based on sequences used as synthetic substrates of MMP-2 and MMP-9, and sequences based on substrates of uPA were designed. Fig. 30 shows four kinds of sequences: two sequences

designed based on the sequence of synthetic substrates utilized as substrates of MMP-2 and MMP-9 (Netzel-Arnett, S. et al., Anal. Biochem. 195, 86-92, 1991) with additional modifications [PLG1MTS (SEQ ID NO: 3) and PLG1LGL (SEQ ID NO: 31); hereinafter, F proteins comprising these sequences is referred to as F(MMP#2) and F(MMP#3), respectively]; another sequence designed by inserting only the three-amino acid sequence, PLG, that is common to synthetic substrates of MMP (hereinafter, the F protein having this sequence is referred to as F(MMP#4)); and the sequence designed based on a substrate of uPA, VGR (SEQ ID NO: 6), (hereinafter, the F protein comprising this sequence is referred to as F(uPA)).

For actual sequence designing to achieve a more selective action towards the MMPs of interest (MMP-2 and MMP-9), the sequences of commercially available synthetic substrates, as well as reports that made detailed examinations of substrate specificity (Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19(7), 661-667, 2001; Chen, E.I. et al., J. Biol. Chem. 277(6), 4485-4491, 2002) can be referenced. Particularly for MMP-9, a consensus sequence from P3 to P2', Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) (X= any residues; Hy= hydrophobic residues), is recommended (Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. 276(23), 20572-20578, 2001). Therefore, F(MMP#2) was newly designed as the present design, PLG;MTS, from the sequence of the original synthetic substrate, PLG;MWS, so that it matches the consensus sequence.

The gene construction scheme is shown in Fig. 31. The full-length genomic cDNA (pSeV18+/ Δ M-GFP) of M-deficient Sendai virus, in which an EGFP gene is inserted at M-deficient site, was digested with SalI and NheI. The fragment (9634 bp) comprising the F gene was separated by agarose gel electrophoresis, and then the corresponding band was cut out and collected with QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN, Bothell, WA). The obtained fragment was subcloned into the SalI/NheI site of LITMUS38 (New England Biolabs, Beverly, MA) (construction of LitmusSalI/NheIfrg Δ M-GFP). Mutagenesis to the F gene was performed on this LitmusSalI/NheIfrg Δ M-GFP, using QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the method described in the kit. The sequences of the synthetic oligos used for the mutagenesis were as follows:

5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCatGaCGAGtTTCTTCGGTGCTGT GATTGGTACTATC-3' (SEQ ID NO: 32) and

5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAaCTCGtCatGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTA
TCATTGGTGACAG-3' (SEQ ID NO: 33) for the conversion to F(MMP#2);
5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCCtGggGttATTCTTCGGTGCTGT
GATTGGTACTATCG-3' (SEQ ID NO: 34)
and

5'-CGATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAATaaCccCaGGccAagAggGGCATTTTGTGTCGT

ATCATTGGTGACAG-3' (SEQ ID NO: 35) for the conversion to F(MMP#3);

5'-CAAAATGCCGGTGCTCCCCCGTtGgGATTCTTCGGTGCTGTGATT-3' (SEQ ID NO: 36)

and

5'-AATCACAGCACCGAAGAATCcCaACgGGGGAGCACCGGCATTTTG-3' (SEQ ID NO: 37) for the conversion to F(MMP#4);

and 5'-GACACAAAATGCCGGTGCTCCCgtGggGAGATTCTTCGGTGCTGTGATTG-3' (SEQ ID NO: 38)

and 5'-CAATCACAGCACCGAAGAATCTCccCacGGGAGCACCGGCATTTTGTGTC-3' (SEQ ID NO: 39) for the conversion to F(uPA).

Lower case letters indicate mutated nucleotides.

20

25

30

35

LitmusSalI/NheIfrgAM-GFP comprising an objective mutation on the F gene was digested with SalI/NheI to collect a fragment (9634 bp) comprising the F gene. The full-length genomic cDNA of F-deficient Sendai virus comprising the EGFP gene at the F-deficient site $(pSeV18+/\Delta F-GFP: Li, H.-O. et al., J. Virol. 74, 6564-6569, 2000;$ WO 00/70070) was digested with SalI and NheI to collect an NP gene-comprising fragment (8294 bp), and a multicloning site was introduced to the fragment using synthetic oligo DNA to obtain a plasmid (pSeV/ΔSalINheIfrq-MCS: PCT/JP00/06051). The obtained plasmid was digested with SalI and NheI to collect a fragment (8294 bp). These collected fragments were ligated to each other to construct an M-deficient SeV CDNA $(pSeV18+/F(MMP#2)\Delta M-GFP,$ pSeV18+/F(MMP#3) \Delta M-GFP, or pSeV18+/F(MMP#4) \Delta M-GFP) comprising the F(MMP#2), F(MMP#3), or F(MMP#4) gene (an Fgene designed to be activated by MMP), and M-deficient SeV cDNA (pSeV18+/F(uPA)ΔM-GFP) comprising the F(uPA) gene (an F gene designed to be activated by uPA).

[Example 17] Reconstitution and amplification of an M-deficient SeV vector having a modified F activation site:

Reconstitution of the virus was performed according to the procedure reported by Li et al. (Li, H.-O. et al., J. Virol. 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070). Since the virus was an M-deficient form, the above-mentioned helper cells (as in Example 11) that provide the M protein in trans were used. The Cre/loxP expression induction system was used for helper cell production. The system utilized the pCALNdLw plasmid designed to induce the expression of gene products with Cre DNA recombinase (Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1988). Thus, a recombinant adenovirus (AxCANCre) expressing Cre DNA recombinase was infected to the transformant of this plasmid using the method of Saito et al. (Saito, I. et al., Nucleic Acids Res. 23, 3816-3821, 1995; Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1998) to express the inserted genes (see Examples 11 and 12).

15

20

25

30

35

The reconstitution of the M-deficient SeV in which the activation site of F was modified was performed as follows. LLC-MK2 cells were plated onto a 100-mm dish at a density of 5x 10⁶ cells/dish and incubated for 24 hours. Recombinant vaccinia viruses (PLWUV-VacT7: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986) expressing T7 polymerase was treated with psoralen under ultraviolet A irradiation (365 nm) for 20 minutes, and infected (at MOI= 2) to the cells at room temperature for one hour. The cells were washed with pSeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP (alternatively, serum-free MEM. pSeV18+/F(MMP#3) Δ M-GFP, pSeV18+/F(MMP#4) Δ M-GFP, pSeV18+/F(uPA) ΔM-GFP), pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996), and pGEM/F-HN (Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070) plasmids were suspended in Opti-MEM (Gibco-BRL, Rockville, MD) at densities of 12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g, and 4 µg per dish, respectively. SuperFect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) corresponding to 5 μL per 1 μg DNA was added to respective solutions, mixed, and then allowed standing at room temperature for 15 minutes. Finally, the mixture was added to 3 mL of Opti-MEM comprising FBS at a final concentration of 3%, and then added to the cells for culture. After five hours of culturing, the cells were washed twice in serum-free MEM, and were cultured in MEM

containing 40 $\mu\text{g/mL}$ Cytosine $\beta\text{-D-arabinofuranoside}$ (AraC: Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 μ g/mL trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD). After culturing for 24 hours, cells (LLC-MK2/F7/M62/A) that continuously expressed the Mprotein were layered at a density of 8.5x106 cells/dish, and cultured in MEM containing 40 $\mu g/mL$ AraC and 7.5 $\mu g/mL$ trypsin at 37°C for another two days (P0). These cells were collected and the pellet was suspended in 2 mL/dish of Opti-MEM. After repeating three cycles of freezing and thawing, the lysate was directly transfected to LLC-MK2/F7/M62/A, and cultured at 32°C in serum-free MEM containing 40 μg/mL AraC, 7.5 μg/mL Trypsin, and 50 U/mL type IV collagenase (ICN, Aurola, OH) (P1). Three to 14 days later, a portion of the culture supernatant was sampled and infected to freshly prepared LLC-MK2/F7/A, and cultured at 32°C in serum-free MEM containing 40 μg/mL AraC, 7.5 μg/mL trypsin, and 50 U/mL type IV collagenase (P2). Three to 14 days later, this was reinfected to freshly prepared LLC-MK2/F7/M62/A and cultured at 32°C for 3 to 7 days in serum-free MEM containing 7.5 μg/mL trypsin and 50 U/mL type IV collagenase (P3). BSA was added to the collected culture supernatant to a final concentration of 1%, and culture was stored at -80°C. The viral stock solution was thawed for later production and in vitro experiments.

15

20

25

35

Furthermore, helper cells (LLC-MK2/F7/M62-#33) which enables production of the M-deficient SeV vector at higher titers was successfully obtained by introducing the SeV-M gene (and SeV-F gene) of the same system (pCALNdLw: Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1988) into LLC-MK2/F7/M62 as the helper cell that provides the M protein in trans and continuing the cloning of cells. Using these cells, an M-deficient SeV vector (SeV18+/ Δ M-GFP) in which the F gene has not been mutated can be produced at titers of 1x 10 8 GFP-CIU/mL (GFP-CIU is defined in WO 00/70070) or more. In addition, the use of these cells accomplished also the preparation of both SeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP and SeV18+/F(uPA) Δ M-GFP at a titer of 1x 10 8 GFP-CIU/mL or more.

When reconstitution was similarly performed for SeV18+/F(MMP#3) Δ M-GFP and SeV18+/F(MMP#4) Δ M-GFP, no viral particles could be collected. In order to collect these viral particles, conditions for reconstitution must be further examined. Considering the fact that they could not be collected under the same conditions,

there may be problems with the design of the F1/F2 cleavage sites (activation sites of F protein) in F (MMP#3) and F (MMP#4), which cause, for example, poor cleavage efficiency or weak activity of the cleaved F protein. On the other hand, since high titers of viral particles were collected with the design of F(MMP#2), this was considered to be a good design which shows good cleavage efficiency, and which does not affect the activity of the cleaved F protein.

[Example 18] Preparation of in vivo samples of an M-deficient SeV vector having a modified F activation site:

10

15

20

25

Various M-deficient SeV vectors for in vivo examinations were prepared by simple purification, wherein the viral particles were spun down by centrifugation. LLC-MK2/F7/M62-#33 was grown in a 6-well plate until nearly confluent, infected with AxCANCre (MOI = 5), and then cultured at 32°C for two days. These cells were infected with SeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP or SeV18+/ Δ M-GFP at MOI= 0.5. Then, the cells were cultured for three days at 32°C in serum-free MEM (1 mL/well) containing 7.5 µg/mL trypsin and 50 U/mL type IV collagenase for SeV18+/F(MMP#2) \(\Delta M - GFP; \) and in serum-free MEM (1 mL/well) containing only 7.5 $\mu g/mL$ trypsin for SeV18+/ ΔM -GFP. The supernatants were collected from the six wells and combined together, then centrifuged at 2,190 xg for 15 minutes. The collected supernatants were passed through a filter with pores having ah inside diameter of $0.45 \mu m$, and then further centrifuged at 40,000 xg for 30 minutes. The resulting pellet was suspended in 500 μL of PBS to prepare purified virus solutions. The titer of the M-deficient SeV vectors prepared as $1.3x ext{ } 10^9 ext{ } and ext{ } 4.5x ext{ } 10^9 ext{ } GFP-CIU/mL$ described above was SeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP and SeV18+/ Δ M-GFP, respectively. proteins in the viruses prepared in Examples 17 and 18 are cleaved, 30 and the viruses have infectivity. Such SeVs are called F-cleaved SeV or infective SeV. Hereinafter, SeV18+/ Δ M-GFP, SeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP, and SeV18+/F(uPA) Δ M-GFP are also abbreviated as SeV/ Δ M-GFP, SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP, and SeV/F(uPA) Δ M-GFP, respectively.

35 [Example 19] Method for evaluating protease-dependent infection and cell fusogenic infection of F-modified, M-deficient SeV vectors:

<1> Exogenous experiment:

.10

15

20

25

30

An infection procedure in which an extracellular protease is added to a cell line is called an exogenous experiment. The basic procedure of the exogenous experiment performed in the following Examples is described below. The use of different conditions is described in respective Examples. LLC-MK2 was cultured until confluence in a 96-well plate (5x 10⁵ cells/well). After washing twice with MEM, 50 μL MEM containing SeV [F-cleaved form: 1x 10 5 CIU/mL. or F-uncleaved form: 1x 107 particles/mL (in HA units; see Example 25)] was added and infected to the cells. Simultaneously, 50 μL of protease-containing MEM was also added thereto, and the cells were cultured at 37°C. Four days later, the spread of the infection was observed under a fluorescent microscope. The number of cells expressing GFP per cells in 1 mm² was counted. The proteases to be used were purchased from ICN Biomedicals Inc. for collagenase (type IV collagenase), and MMP-2 (active MMP-2), MMP-3, MMP-7, MMP-9 (active MMP-9), and plasmin were purchased from COSMO BIO Co. 1td.

<2> Endogenous experiment:

An infection procedure achieved by intracellularly expressed protease without extracellular addition of protease is called an endogenous experiment. The basic procedure of the endogenous experiment performed in the following Examples is described below. The use of different conditions is described in respective Examples. Respective cancer cells were cultured in a 96-well plate until confluence (5x 10⁵ cells/well). After washing twice with MEM, 50 µL MEM containing SeV [F-cleaved form: 1x 10⁵ CIU/mL or F-uncleaved form: 1x 10⁷ HAU/mL (see Example 25)] was added and infected to the cells. Simultaneously, FBS was added to the medium at a final concentration of 1%. Four days later, the spread of the infection was observed under a fluorescent microscope. The number of cells expressing GFP per cells in 1 mm² was counted.

35 [Example 20] Protease-dependent cell fusogenic infection by an F-modified M-deficient Sendai viral vector (Exogenous experiment):

5

10

15

20

25

30

35

Using LLC-MK2 cells that hardly express proteases, modification of F was confirmed and assayed by the above-mentioned exogenous experiment to determine whether it causes protease-dependent cell fusogenic infection (Fig. 32). Three types of M-deficient SeVs (as in Example 17), SeV/ Δ M-GFP, SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP, and SeV/F(uPA) Δ M-GFP, were infected to cells. Simultaneously, 0.1 $\mu g/mL$ each of type IV collagenase (Clostridium histolyticum), active MMP-2, active MMP-9, or uPA, or 7.5 μg/mL trypsin was added thereto. Four days later, cells were observed under a fluorescence microscope. Only in LLC-MK2 to which trypsin was added, SeV/ΔM-GFP with unmodified F caused cell fusion of the infected cells with their surrounding cells, resulting in cell fusogenic infection and multinuclear cell (syncytia) SeV/F(MMP#2) \Delta M-GFP inserted with an MMP formation(Fig. 32L). degradation sequence into the F protein gene showed cell fusogenic infection of LLC-MK2 to which collagenase, active MMP-2, and active MMP-9 hade been added, resulting in formation of syncytia (Fig. 32E, 32F, and 32M). On the other hand, SeV/F(uPA)ΔM-GFP inserted with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and tissue-type PA (tPA) degradation sequences into the F protein showed cell fusogenic infection in the presence of trypsin, and, upon further modification of the F protein, showed the formation of syncytia, multinuclear cells, in the presence of uPA (Fig. 32Q and 32R). These results indicate that, due to the incorporation of each of the protease degradation substrate sequences into the F protein, an M-deficient SeV causes degradation substrate sequence-dependent cell fusogenic infection and spread to contacting cells.

[Example 21] MMP expression-specific cell fusogenic infection of cancer cell lines (Endogenous experiment):

Using the SeV prepared in Example 17, an endogenous experiment was performed to determine whether or not endogenous protease selective cell fusogenic infection occurs. An MMP-expressing cancer cell line, HT1080 (human fibroblastic sarcoma) (Morodomi, T. et al., Biochem. J. 285(Pt 2), 603-611, 1992), a tPA-expressing cell line, MKN28 (human gastric cancer cell line) (Koshikawa, N. et al., Cancer Res. 52, 5046-5053, 1992), and a cell line expressing neither protease,

SW620 (human colon cancer line), were used. MKN28 was provided from Riken Institute of Physical and Chemical Research (Cell No. RCB1000), while HT1080 (ATCC No. CCL-121) and SW620 (ATCC No. CCL-227), as well as SW480 (ATCC No. CCL-228), WiDr (ATCC No. CCL-218), and Panc-1 (ATCC No. CRL-1469) that were used in the following Examples were provided from American type culture collection (ATCC). The media used at the respective institutions that handed out the cells were used in the experiment. In addition, FBS was added to all of the media at a final concentration of 1%. As shown in Fig. 33, in MMP-expressing cell line, HT1080, only the infection with SeV/F (MMP#2) Δ M-GFP spread ten times or more. Furthermore, in tPA-expressing cell line, MKN28, cell fusogenic infection spread with only SeV/F (uPA) Δ M-GFP. In SW620, which expresses neither protease, no spreading of infection was observed at all.

15

20

25

30

35

10

[Example 22] Cell fusogenic infection due to MMP induction by phorbol ester:

MMP is reported to be induced in vivo in cancer cells due to the growth factors and such existing around the cells. This phenomenon can be reproduced in vitro using a phorbol ester, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). To investigate infection that occurs under reproduced conditions in which MMP expression is induced, PancI, a pancreatic cancer cell line known to activate MMP-2 and induce MMP-9 via PMA, was used to examine the presence or absence of cell fusogenic infection by F-modified M-deficient SeV vector (Zervos, E.E. et al., J. Surg. Res. 84, 162-167, 1999). PancI and other cancer cell lines were cultured in a 96-well plate until confluence (5x 10⁵ cells/well). The endogenous experiment was performed using SeV prepared in Example 17. After washing twice with MEM, 50 μL MEM containing 1x 10⁵ CIU/mL SeV was added for infection (at MOI = 0.01). The same amount (50 μ L) of MEM containing 40 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma) was added thereto. Simultaneously, FBS was added to the medium at a final concentration of 1%.

The induced expression of MMP-2 and MMP-9 was confirmed by gelatin zymography in which the portion where gelatinolytic activity exists becomes clear (Johansson, S., and Smedsrod, B., J. Biol. Chem.

261, 4363-4366, 1986). Specifically, the supernatant of each culture was collected and dissolved in a sample buffer. This was mixed with acrylamide to a final concentration of 1 mg/mL gelatin to prepare an 8% acrylamide gel. After SDS polyacrylamide gel electrophoresis, the gel was washed with 10 mM Tris (pH 8.0) and 2.5% Triton X-100, incubated in gelatinase activation buffer (50 mM Tris, 0.5 mM CaCl₂, 10⁻⁶ M ZnCl₂) at 37°C for one day, and stained with 1% Coomassie Blue R-250, 5% acetic acid, and 10% methanol (top panel of Fig. 34). "C" represents the control, and "T" the supernatant of a sample induced by 20 nM PMA. This panel shows that MMP-9 is induced in HT1080 and Panc I. Latent MMP-2 has been detected before induction in Panc I. However, this latent form is known to have hardly any gelatinolytic activity. As shown in Fig. 34 (lower panel), Panc I infected with SeV/F (MMP#2)ΔM-GFP indicated cell fusogenic infection by MMP induction.

[Example 23] Spread of infection with SeV/F (MMP#2) Δ M-GFP in an HT1080 cell line in vivo:

15

2Ó

25

35

HT1080 carcinoma-bearing nude mice were produced. 5x 10⁶ cells of a human fibroblastoma cell line, HT1080, (50 µL of 1x 108 cells/mL), were injected subcutaneously to the right dorsal skin of BALB/c nude mice (Charles River). Seven to nine days later, animals having a tumor with a diameter of more than 3 mm were used. The volume of the carcinoma, its shape presumed to be elliptical, was 30 to 100 mm3. Fifty uL of the following F-cleaved SeV was injected once to the carcinoma: MEM (control) (N= 5); MEM containing SeV-GFP (1x 108 CIU/mL) (N= 5); MEM containing SeV/\DeltaM-GFP (1x 108 CIU/mL) (N= 7); and MEM containing SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP (1x 10⁸ CIU/mL) (N= 7). Two days later, the carcinomas were observed under a fluorescence microscope (Fig. 35). Fluorescence is observed only in the area around the injected site for SeV-GFP and SeV/ΔM-GFP (Fig. 35E and 35H). In contrast, for SeV/F(MMP#2)ΔM-GFP, fluorescence was observed to spread throughout the entire carcinoma (Fig. 35K). Enlarged images show fluorescence from individual cells for SeV-GFP and SeV/ Δ M-GFP, whereas, for SeV/F(MMP#2)ΔM-GFP, the shape of the cells is unclear, suggesting fusion of the cells. Furthermore, the area of the entire carcinoma

and the area of GFP expression in the above pictures were determined by NIH image. The proportions of the GFP expression region in the entire cancer were 10% for SeV-GFP and 20% for SeV/ Δ M-GFP, and, in contrast, 90% for SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP, clearly indicating the spread of infection (Fig. 36). In tissues other than cancer tissues, cell fusogenic infection was hardly observed in the fascia and subcutaneous connective tissues existing at the border to the cancer cells. Thus, under these conditions, infection was determined not to spread to normal tissues other than cancer tissues.

10

20

25

30

35

[Example 24] Anti-tumor effect of an F-modified M-deficient SeV vector on carcinoma-bearing nude mice:

HT1080 tumor-bearing mice were produced in the same manner as described in Fig. 35. Eight or nine days later, animals having a tumor with a diameter of more than 3 mm were selected, and 50 µL of the following four kinds of F-cleaved SeV were injected to the cancerous site: MEM (N= 5); MEM containing SeV-GFP (1x 108 CIU/mL) (N= 5); MEM containing SeV/ Δ M-GFP (1x 10 8 CIU/mL) (N= 7); and MEM containing SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP (1x 10⁸ CIU/mL) (N= 7). Two days later, equal amounts of SeV were injected again to the cancerous site. The lengths of the long axis (a), short axis (b), and thickness (c) of the cancerous site was measured every other day. Assuming the carcinoma is an ellipsoid, the carcinoma volume V was calculated as $V = \pi/6 \times abc$. The carcinoma to which PBS, SeV-GFP, and SeV/ΔM-GFP were administered, respectively, rapidly. In enlarged SeV/F(MMP#2) \Delta M-GFP-administered carcinoma, in which the vector had spread throughout the carcinoma as shown in Fig. 37, clearly indicated no proliferation and remained small. Analysis of significant difference by t-test showed that it is significantly smaller compared to the other three groups at P< 0.05. This indicates that the vector has anticancer effect even without therapeutic genes.

[Example 25] Production and selective infection of an F-uncleaved/F-modified M-deficient SeV vector:

In the production procedure of the SeV vector used above, culture was performed in a medium containing a high concentration (7.5 $\mu g/mL$)

of trypsin and 50 U/mL collagenase to induce the cleavage of F, and the F-cleaved vector was collected (see Examples 17 and 18). In the present Example, to accomplish protease-dependent selection during infection, an F-uncleaved SeV was produced by collecting SeV without adding proteases during production.

Specifically, LLC-MK2/F7/M62/A cells were cultured in a 10-cm dish until confluence. Each of the F-modified M-deficient SeVs prepared in Example 17 were infected to cells (MOI=5). One hour later, the supernatant was removed and washed twice with MEM medium. 4 mL MEM was added to the cells and then cultured at 32°C. Five days later, the supernatant was collected, and bovine serum albumin (BSA) was added to a final concentration of 1%. After measuring the HAU titer, the supernatant was stored at -70°C until use. Each of the F-modified M-deficient SeVs were collected in the range of 2⁷ to 2¹⁰ HAU/mL (1 HAU= 1x 10⁶ viral particles/mL, and therefore this corresponds to 1x 10⁸ to 1x 10⁹ particles/mL) and were adjusted to 1x 10⁸ particles/mL by dilution.

The results of this exogenous experiment confirmed the production of vectors that infect LLC-MK2 in MMP-dependent and uPA-or tPA-dependent manners by SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP and SeV/F(uPA) Δ M-GFP, respectively (the data of exogenous proteases are not shown). In addition, whether selective infection due to protease expression is possible in MMP-expressing HT1080 strain, tPA-expressing MKN28 strain, and SW620 which hardly expresses the proteases, was tested by endogenous experiments (Fig. 38). SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP infects to MMP-expressing HT1080 strain, but not to tPA-expressing MKN28 strain. SeV/F(uPA) Δ M-GFP infects to tPA-expressing MKN28 strain but not to MMP-expressing HT1080 strain. As shown above, each of the SeVs showed selective infection in a protease-dependent manner.

30

35

10

20

25

[Example 26] F-modified M-deficient SeV vector infection due to MMP-3 and MMP-7 induction via human fibroblasts:

SW480 and WiDr were shown to induce MMP-3 and MMP-7, respectively, through co-culture with fibroblasts or *in vivo* culture (Kataoka, H. et al., Oncol. Res. 9, 101-109, 1997; Mc Donnell, S. et al., Clin. Exp. Metastasis. 17, 341-349, 1999). These cells were used to

investigate whether infection of F-modified M-deficient SeV vector changes in vivo. Each cancer cell line was cultured in a 96-well plate until confluence ($5x\ 10^4\ cells/well$). After washing twice with MEM, 50 µL MEM containing 1 HAU/mL (1 HAU= $1x\ 10^6\ viral\ particles/mL$, and thus, corresponding to $1x\ 10^6\ particles/mL$) of F-uncleaved SeV, was added for infection. Normal human lung fibroblasts (TAKARA) were added at a concentration of $5x\ 10^4\ cells/well$ to the cells and cultured for four days at 37° C (Fig. 39). SW480 and WiDr were infected by SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP, through co-culturing with human fibroblasts. Such a phenomenon is not observed in SW620, which is not inducible.

[Example 27] MMP-selective infection of an F-modified M-deficient SeV vector to human aortic smooth muscle cells:

Aberrant expression of MMP has been reported in arteriosclerosis, rheumatoid arthritis, wound healing, in addition to cancer (Galis, Z.S., and Khatri, J.J., Circ. Res. 90, 251-262, 2002; Martel-Pelletier, J. et al., Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 15, 805-829, 2001).

To demonstrate the applicability of F-modified M-deleted SeV vectors to these diseases, MMP-selective infection of the vectors to human aortic smooth muscle cells was directed. Human smooth muscle cells (TAKARA) were cultured in a 96-well plate until confluence (5x 10⁵ cells/well). After washing twice with MEM, 50 µL MEM containing SeV (F-uncleaved form: 1 HAU/mL (1x 10⁶ particles/mL)) was added to cells for infection. The equal amount (50 protease-containing MEM was added thereto and cultured for four days at 37°C. The number of cells expressing GFP per cells in 1 mm2 was counted (Fig. 40). Infection of SeV/ Δ M-GFP was enhanced only by the addition of trypsin, whereas infection of SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP was enhanced by the addition of collagenase, MMP-2, MMP-3, and MMP-9.

30

35

10

20

25

[Example 28] Protease-dependent cleavage of the F protein in F-modified M-deficient SeV vectors:

As shown in Example 20, by incorporating each of the protease degradation sequences into the F protein, F-modified M-deficient SeV vector showed cell fusogenic infection dependent on those degradation sequences. Furthermore, whether cleavage of F0 occurs in a

protease'-dependent manner after modification was confirmed by Western blotting. Sampling of viruses was performed by the following method. Three types of viral particles, SeV/\DeltaM, SeV/F(MMP#2)\DeltaM, SeV/F(uPA) Δ M, were infected at MOI= 3 to M protein-induced helper cells. Two days after infection, the supernatants were collected and centrifuged at 18,500 xg for three hours, and the precipitates were resuspended in PBS. To each of the virus suspensions, proteases were added at final concentrations of 7.5 µg/mL for trypsin, 0.1 ng/mL for MMP-9, and 0.1 ng/mL for uPA and incubated at 37°C for 30 minutes. Sample buffer was added to each mixture to prepare SDS-PAGE samples. 10 SDS-PAGE and Western blotting were performed according to standard methods (Kido, H. et al. "Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein." J Biol Chem 267, 13573-13579, 1992). Rabbit anti-F1 antibody was obtained as 15 antiserum by immunization of a mixture of three synthetic peptides (FFGAVIGT+Cys: 117-124, EAREAKRDIALIK: 143-155, and CGTGRRPISQDRS: 401-413; which are SEQ ID NOs: 46, 47, and 48, respectively). HRP-labeled anti-rabbit IgG antibody (ICN, Aurola, OH) was used as the secondary antibody, and chemical fluorescence method (ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) was used for detecting developed colors. Fig. 41 shows the results of treatment with an M-deficient SeV vector comprising unmodified F (1, 4, 7, and 10), an M-deficient SeV vector inserted with MMP#2 sequence into F (2, 5, 8, and 11), and an M-deficient SeV vector inserted 25 with uPA sequence into F (3, 6, 9, and 12) with the above-mentioned proteases at 37°C for 30 minutes.

As shown in Fig. 41, cleavage of F1 occurred, according to the respective inserted protease substrates, i.e., in the presence of trypsin for the M-deficient SeV vector with unmodified F, in the presence of MMP for the M-deficient SeV vector inserted with MMP#2 sequence into F, and in the presence of uPA for the M-deficient SeV vector inserted with uPA into F. Although not shown herein, for the M-deficient SeV vector into which uPA sequence is inserted, cleavage of F1 was observed in the presence of trypsin when the degradation time was prolonged to four hours. This agrees well with the results

of Example 20, and indicates that syncytium formation occurs in an F cleavage-dependent manner.

[Example 29] Increase of fusibility by cytoplasmic domain-deletion of the F protein:

Infiltration of the paramyxovirus to the host is accomplished by the fusion of the viral membrane and the host cell membrane. In this infiltration mechanism, the HN protein of the Sendai virus binds to the sialic acid of the host, and the F protein causes cell membrane fusion. During this step, the conformational change of the F protein resulting from the binding of HN has been suggested to be important (Russell, C.J., Jardetzky, T.S. and Lamb, R.A., "Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion." EMBO J. 20, 4024-34, 2001). Therefore, most of the F proteins of paramyxoviruses do not show fusogenicity of cells when they are expressed alone on cells. Only cells that simultaneously express the HN protein have fusiogenicity. The deletion of cytoplasmic domains within the F and HN proteins in a paramyxovirus is known to increase its fusiogenicity (Cathomen, T., Naim, H.Y. and Cattaneo, R., "Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence." J. Virol. 72, 1224-34, 1998). To determine which deletion mutant of the cytoplasmic domain of the F protein in Sendai virus causes the largest increase in fusogenicity, deletion mutants were prepared and inserted into pCAGGS expression vector (Niwa, H. et al., Gene 108, 193-199, 1991). An HN-carrying pCAGGS was co-transfected and the resulting fusogenicity was confirmed from the number of formed syncytia.

10

20

25

PCR was performed on each of the mutant genes, in which the cytoplasmic domain of F had been deleted, using the primers as shown below, the resulting fragments were treated with XhoI and NotI, and then ligated to the pCAGGS vector. Primers used for PCR were as follows:

Fct27 primers (5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3'/SEQ ID NO: 49, and 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCATCTGATCTTCGGCTCTAATGT-3'/SEQ ID NO: 50); Fct14 primers (5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3'/SEQ ID NO: 51, and 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3'/SEQ ID NO: 52); and

Fct4 primers (5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3'/SEQ ID NO: 53, and 5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3'/SEQ ID NO: 54)

(Kobayashi M. et al., J. Viol., 77, 2607, 2003).

10

25

30

35

To measure cell fusogenicity, LLC-MK2 or HT1080 cells were plated onto a 24-well plate to reach confluence. 3 µL Fugene 6 was mixed with 50 µL Opti-MEM. 2 µg of each pCAGGS expression plasmid was mixed with an equal amount of pCAGGS/EGFP, and then added to the mixture of Opti-MEM and Fugene 6. After standing at room temperature for 15 minutes, this mixture was added to the 24-well plate in which the media was replaced with 500 μL MEM medium. After culturing at 37°C under 5% CO2 for three hours, the medium was replaced with MEM containing 1% FBS for HT1080, and MEM containing 7.5 μg/mL trypsin or a predetermined concentration of type IV collagenase (Clostridium) for LLC-MK2. After culturing for 48 hours, the number of fused syncytia per x100 visual field (0.3 cm²) of an inverted microscope was counted. Alternatively, the cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde for two hours, transferred to 70% ethanol and then to distilled water, stained for five minutes with hematoxylin, and washed with water to count the number of syncytium-forming nuclei in every 0.3 cm².

Three kinds of amino acid sequences of the F protein in which the cytoplasmic domain has been deleted are shown in Fig. 42(A), and their fusion activities are shown in Fig. 42(B). As indicated in Fig. 42(B), cells in which only the F protein were expressed did not fuse, but co-transfection of HN induced fusogenicity. Furthermore, the F protein (Fct14) having a sequence in which 28 amino acids were deleted so that the cytoplasmic domain becomes 14 amino acids was found to show the highest fusogenicity.

[Example 30] Drastic increases in fusogenicity caused by the F/HN chimeric protein:

The envelope proteins of the paramyxovirus, the F and HN proteins form a trimer and a tetramer, respectively, on the cell membrane, and are known to interact with each other through their ectodomains and M protein (Plemper, R.K., Hammond, A.L. and Cattaneo, R., "Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum." J. Biol. Chem. 276, 44239-22346, 2001). As shown in Fig. 42, the F protein alone does not show fusogenicity, and the HN protein is essential for its fusogenicity. Therefore, a chimeric protein

comprising the F and HN proteins was produced to produce vectors having enhanced fusogenicity by simultaneously expressing the F and HN proteins as a fusion protein on the same cell membrane. The F protein is a type II membrane protein and HN is a type I membrane protein. Therefore, as shown in Fig. 43(A), the chimeric protein (Fct14/HN) was prepared to form a U-shape on the cell membrane and comprise two transmembrane domains. Fct14 showing high fusogenicity was used as the F protein. A linker sequence consisting of 50 amino acids was inserted between the two proteins (Fct 14/Linker/HN). According to database searches at present, this linker sequence does not show homology to any protein. (A non-sense sequence synthesized by inverting from the N-terminus to C-terminus of the amino acid sequence of the cytoplasmic domain of env of simian immunodeficiency virus (SIVagm) was used.)

10

15

20

25

30

The method for producing the expression plasmid of the F/HN chimeric protein gene is specifically described below. The F/HN chimeric protein gene was inserted into the pCAGGS vector. PCRs were performed on the F gene and the HN gene, respectively, and the obtained two fragments were ligated to pCAGGS. During this step, a 150-bp linker gene (50 amino acids) was inserted or nothing was inserted between the F/HN genes. The sequences of the primers utilized are shown below: F gene primers (F-F: 5'-ATCCGAATTCAGTTCAATGACAGCATATATCCAGAG-3'/SEQ ID NO: 55 and

Fct14-R: 5'-ATCCGCGGCCGCCGGTCATCTGGATTACCCATTAGC-3'/SEQ ID NO: 56); Linker/HN gene primers (Linker-HN-F:

5'-ATCCGCGGCCGCAATCGAGGGAAGGTGGTCTGAGTTAAAAATCAGGAGCAACGACGAGGT GAAGGACCAGAGGACGCCAACGACCCACGGGGAAAGGGGTGAACACATCCATATCCAGCCATCT CTACCTGTTTATGGACAGAGGGTTAGG-3'/SEQ ID NO: 57)

and HN-R: 5'-ATCCGCGGCCGCTTAAGACTCGGCCTTGCATAA-3'/SEQ ID NO: 58); and HN gene primers (5'-ATCCGCGGCCGCAATGGATGGTGATAGGGGCA-3'/SEQ ID NO: 59 and 5'-ATCCGCGGCCGCTTAAGACTCGGCCTTGCA-3'/SEQ ID NO: 60).

As shown in Fig. 43(B), although a chimeric protein without the linker sequence shows low fusogenicity, insertion of a linker drastically increases the fusion activity to approximately five times to that obtained by co-transfection of the F and HN proteins.

[Example 31] Maintenance of the function of fusogenicity and substrate specificity:

In order to acquire fusogenicity, the F protein not only has to be expressed simultaneously with the HN protein, but also has to be cleaved into two subunits (F1 and F2) by a protease. In Figs. 42 and 43, the fusogenicity is measured in the presence of trypsin, and the fusogenicity is completely absent under conditions without trypsin. The cleavage sequence of the F protein was modified in the Fct14/Linker/HN chimeric protein shown in Fig. 43 so that it acquires fusogenicity in an MMP-dependent manner. Many degradation substrate sequences of MMP have been reported. Among them, eight kinds of sequences were modified. The amino acid sequence of the cleavage site was modified as shown in Fig. 44 (A) using QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). The sequence of the fusion peptide after cleavage by a protease was considered in the modification. The N-terminal region of F1 of the paramyxoviral F protein, which is called the fusion peptide, is reported to be important for its fusion activity, and fusogenicity of the F protein is sometimes lost by the mutation of amino acids in that region (Bagai, S. and Lamb, R.A., "A glycine to alanine substitution in the paramyxoviral SV5 fusion peptide increases the initial rate of fusion." Virology 238, 283-90, 1997). Therefore, the sequence of the N-terminal region of F1 whose importance has been indicated was left untouched. In that case as well, when inserting the general six-residue sequence known as a degradation substrate of MMP, the design of F1 after degradation by MMP involved addition of three residues to the N-terminus. This indicates that the addition may allow degradation by MMP, but may affect the fusogenicity of the F protein. Thus, in designing an F protein that undergoes MMP-dependent cleavage for activation, following two points must be taken into account: (1) substrate specificity by MMP; and (2) maintenance of fusogenicity of the F protein after cleavage.

.10

15

20

25

30

35

MMP#1 is most well-known sequence as a synthetic substrate of MPP. This sequence is also used for targeting other MMPs. MMP#3 and MMP#8 are also commercially available sequences as synthetic substrates. The sequence of the degradation substrate, PLGMWS, of

MMP-2 and MMP-9 were modified to PLGMTS and PQGMTS (SEQ ID NOs: 61 and 62, respectively) as MMP#2 and MMP#6, respectively, according to the consensus sequence, Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr) for MMP-9 which was revealed by phage display. MMP#5 was constructed as PQGLYA (SEQ ID NO: 63) according to the report by Shneider et al. (American Society of Gene therapy, Annual meeting No.1163, 2002, Boston). In MMP#4, the sequence of the fusion peptide after degradation is not modified. The sequence of MMP#7 was found by a phage display method for MMP-2.

The details of the preparation of expression plasmids that have a modified F activation site in the F/HN fusion gene are shown below. After constructing the F/HN fusion gene, mutagenesis of the activation site of the F protein was performed on pBluescript F/HN. To introduce mutation, QuikChange $^{\text{TM}}$ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) was used according to the method described in the kit.

The sequences of synthetic oligos used for the mutagenesis were as follows:

F(MMP#1):

10

- (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCCtGggGttATTCTTCGGT GCTGTGATTGGTACTATCG-3'/SEQ ID NO: 64, and
- 5'-CGATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAATaa
 CccCaGGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/SEQ ID NO: 65);
 F(MMP#2):
 - (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCatGaCGAGtTTCTTCGGTGCTG TGATTGGTACTATC-3'/SEQ ID NO: 32, and
- 25 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAaCTCGtCatGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTA
 TCATTGGTGACAG-3'/SEQ ID NO: 33);

F(MMP#3):

- (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCCtGggGttATTCTTCGGTGCTG
 TGATTGGTACTATCG-3'/SEO ID NO: 34, and
- 30 5'-CGATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAATaaCccCaGGccAagAggGGCATTTTGTGTCGT
 ATCATTGGTGACAG-3'/SEQ ID NO: 35);
 F(MMP#4):
 - (5'-CAAAATGCCGGTGCTCCCCCGTtGgGATTCTTCGGTGCTGTGATT-33'/SEQ ID NO: 36, and 5'-AATCACAGCACCGAAGAATCcCaACqGGGGAGCACCGGCATTTTG-3'/SEQ ID
- 35 NO: 37); F(MMP#5):

- (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCCcTcagggCttGtatgctTTCTTCGGTGCTG
 TGATTGGTACTATC-3'/SEQ ID NO: 66, and
 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAagcataCaaGccctgAggGGCATTTTGTGTCGTA
 TCATTGGTGACAG-3'/SEO ID NO: 67);
- 5 ' F(MMP#6):

25

30

- (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTcaaggCatGaCGAGtTTCTTCGGTGCTG TGATTGGTACTATC-33'/SEQ ID NO: 68, and 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAA aCTCGtCatGccttgAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/SEQ ID NO: 69); F(MMP#7):
- 10 CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCCtTgcTtaCtataCGgctTTCTTCGGTGCTGTGAT
 TGGTACTATC-3'/SEQ ID NO: 70, and
 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAagcCGtataGtaAgcAagGGCATTTTGTGTCGTA
 TCATTGGTGACAG-3'/SEQ ID NO: 71); and
 F (MMP#8):
- 15 (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCttGgCGAGaTTCTTCGGTGCTG
 TGATTGGTACTATC-3'/SEQ ID NO: 72, and
 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAtCTCGcCaaGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTA
 TCATTGGTGACAG-3'/SEO ID NO: 73).

The lower case letters indicates the mutated nucleotides. After modification, the sequences were cut out with *Eco*RI and ligated to pCAGGS.

Each of the vectors comprising the respective sequences and a vector comprising the EGFP gene (pCAGGS/EGFP) were mixed at equal amounts, and the mixture was transfected to HT1080 that highly express MMP. As a result, only when the genes of the sequences of MMP#2 and MMP#6 had been introduced, cell fusion occurred, and syncytia were formed (Fig. 4(B)). These sequences are in common that an Hy-S/T-S/T sequence (MTS) is added to the N-terminus of the F1 protein after cleavage with the protease. Therefore, the addition of the Hy-S/T-S/T sequence (particularly MTS sequence) was considered to very likely fulfill the requirements (1) cleavage of the F protein by HT1080-derived MMP, and (2) maintenance of fusogenicity of the F protein after cleavage. On the other hand, no cell fusion was observed for MMP#1, MMP#3, MMP#4, MMP#5, MMP#7, and MMP#8 at all. Since all the sequences, with the exception of MMP#4, are derived from synthetic substrates of MMP and are expected to be cleaved by proteases, the

peptide of three amino acids added to F1 was suggested to limit the activity of the cleaved F protein. Regarding MMP#4, under this condition, it is highly unlikely that the cleavage itself does not take place. While the data is not shown, this is obvious from the fact that syncytium formation is observed with MMP#4 due to induction of MMP by the phorbol ester in HT1080.

5

10

20

35

Furthermore, in addition to the comparison of the fusogenicity of the sequences of MMP#2 and MMP#6, the MMP concentration-dependent cell fusogenicity of a sequence in which the 7th and 12th residues from the N-terminus of the fusion peptide sequence of #6 were modified from G to A was measured (Fig. 45). The sequences of synthetic oligos used for mutagenesis of this F/HN fusion gene were as follows: 5'-CTTCGGTGCTGTGATTGcTACTATCGCACTTGCAGTGGCGACATCAGCAC-3' (SEQ ID NO: 74)

and 5'-GTGCTGATGTCGCCACTgCAAGTGCGATAGTAGCAATCACAGCACCGAAG-3' (SEQ 15 ID NO: 75). The lower case letters indicate the mutated nucleotides. Preparation of expression plasmids was performed similarly as described above by, after mutagenesis, cutting out the sequence with EcoRI and then ligating to pCAGGS.

As a result, MMP#6 was found to have two to three times higher fusogenicity compared to MMP#2. Importantly, MMP#6 induces cell fusion even under low protease concentration conditions. Namely, accomplishes activation of the F protein at low concentrations. However, when a mutation from G to A, which has been reported as a mutation increasing the fusogenicity of the F protein (Peisajovich, S.G., Epand, R.F., Epand, R.M. and Shai, Y., "Sendai viral N-terminal fusion peptide consists of two similar repeats, both of which contribute to membrane fusion." Eur. J. Biochem. 269, 4342-50, 2002) was further introduced (#6G12A), the fusogenicity decreased to 1/10 30 or less. These results revealed that, by simply inserting a protease cleavage sequence to modify the tropism by a protease, the activity of the F protein cannot be maintained and causes loss of fusogenicity in most cases. When constructing a virus by introducing an objective degradation sequence, the fusogenicity can be confirmed using this system. In addition, since a significant fusion activity is exhibited by the Fct14/Linker/HN alone carried on pCAGGS, transfection of this

plasmid is predicted to have antitumor effects. Moreover, by introducing this chimeric protein into the M-deficient Sendai virus, further increase of antitumor effects is expected.

5 [Example 32] Construction of an improved F-modified M-deficient SeV genomic cDNA with increased fusogenicity:

10

20

25

. 30

35

Examples 29 and 30 showed increases in fusogenicity through the modification of the F protein carried on the pCAGGS vector. Through similar modification of the M-deficient Sendai viral vector, preparation of an improved F-modified ΔM SeV, in which fusogenicity is increased, was expected. Gene construction of the improved F-modified M-deficient SeV genomic cDNA was performed by the method as described below. SeV/F(MMP#6) AM-GFP was constructed according to the same method as in Example 16. Mutation of the F gene was performed on LITMUSSall/NheIfrg AM-GFP using the oligonucleotide of SEQ ID NO: 69, and QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the method described in the kit. The cDNA of SeV/F(MMP#6) AM-GFP was constructed by ligating a SalI and NheI-digested fragment of the mutated LITMUSSalI/NheIfrg∆M-GFP and a fragment comprising the NP gene (obtained by SalI and NheI digestion of the F-deficient Sendai viral full-length genomic cDNA carrying the EGFP gene at the F-deleted site (pSeV+18/F-GFP; Li, H et al., J. Viol. 74, 6564-6569, 2000; WO00/70070))(Fig. 46). Multicloning site Sendai viral cDNA (referred to as pSeV(TDK)) (JP-A 2002-272465) was used as the basic framework for the construction of M-deficient Sendai virus in which 28 amino acids of the cytoplasmic domain of the F protein were deleted (SeV(TDK)/Fct14(MMP#6) \DeltaM-GFP) M-deficient Sendai virus carrying the F/HN chimeric protein (SeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNΔM-GFP). The M-deficient Sendai virus, SeV(TDK)/Fct14(MMP#6)ΔM-GFP, in which the cytoplasmic domain of the F protein has been truncated, was constructed as follows. Since TDK was used as the framework, firstly, pSeV(TDK)/ Δ M-GFP was constructed. GFP/EIS (GFP added with the EIS sequence encoding transcription initiation and termination signals) was amplified by PCR using synthetic primers (Nhe-GFP-F: ATCCGCTAGCCCGTACGGCCATGGTGAGCAAG (SEO ID NO: 94), and

GFP-EIS-BssHII:

10

15

20

25

GFP-EIS-SalI:

ATCCGCGCGCCCGTACGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGAGCTTTACTTGTAC AGCTCGTC (SEQ ID NO: 95)) with LITMUSSall/NheIfrg Δ M-GFP as a template. NheI and BssHII treatments were performed on the multicloning site of Sendai viral cDNA and the amplified GFP/EIS, and the resulting fragments were ligated to substitute the M protein with GFP in order to prepare pSeV(TDK)/ Δ M-GFP.

Fct14 (MMP#6) was amplified by pCAGGS/Fct14(MMP#6)/Linker/HN prepared in Example 31 as a template, using synthetic primers, Mlv-F: ATCCACGCGTCATGACAGCATATATCCAGAG (SEO ID NO: and Fct14-EIS-SalI: ATCCGTCGACACGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACTTTAACGGTCATCT GGATTACC (SEQ ID NO: 97). The Fct14(MMP#6) was inserted into the position of F to replace the F gene, resulting in the construction of pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)ΔM-GFP (Fig. 46). Next, an M-deficient Sendai virus carrying an F/HN chimeric (pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HN Δ M-GFP) was constructed. GFP/EIS was amplified by PCR with GFP as a template, using synthetic primers (Nhe-GFP-F: ATCCGCTAGCCCGTACGGCCATGGTGAGCAAG (SEQ ID NO: 98) and

- ATCCGCTAGCCCGTACGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGAGCTTTACTTGTAC AGCTCGTC (SEQ ID NO: 99)). The GFP/EIS and multicloning site Sendai viral cDNA were treated with NheI and SalI. The resulting fragments were ligated to delete the M and F genes, and substitute with GFP to produce pSeV(TDK)/ Δ M Δ F-GFP. Fct14(MMP#6)/Linker/HN was amplified by PCR with Fct14(MMP#6)/Linker/HN prepared in Example 31 as template, using synthetic primers (F/HN5'Nhe-F: ATCCGCTAGCAGTTCAATGACAGCATATATCCAGAG (SEQ ID NO: 100), and F/HN3'Nhe-EIS-R:
- ATCCGCTAGCACGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACTTTTAAGACTCGGCCTTGCA

 TAA (SEQ ID NO: 101)). pSeV(TDK)/Fct14 (MMP#6)/Linker/HNΔM -GFP was
 constructed by ligating Fct14 (MMP#6)/Linker/HN to the NheI site of
 the above-mentioned pSeV(TDK)/ΔMΔF-GFP.
- 35 [Example 33] Reconstitution and amplification of the improved F-modified M-deficient Sendai virus:

Reconstitution of a virus from the cDNA constructed in Example 32 was performed according to procedure reported by Li et al. (Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070). However, since the cDNA was of the M-deficient form as in Example 17, helper cells that provide the M protein in trans (Example 11) were used. Cre/loxP expression induction system was used for the production of helper cells. This system uses a plasmid, pCALNdLw, that is designed to inducibly express gene products by Cre DNA recombinase (Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1988). The inserted gene was expressed by infecting a recombinant adenovirus (AxCANCre), which expresses Cre DNA recombinase, to the transformant of this plasmid by the method of Saito et al. (Saito, I. et al., Nucleic Acids Res. 23, 3816-3821, 1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121, 1998). The M-deficient SeV in which the activation site of the F protein is substituted was reconstituted as described below. LLC-MK2 cells were plated onto a 100-mm dish at 5x 10⁶ cells/dish, cultured for 24 hours, and then infected at room temperature for one hour with recombinant vaccinia virus (at MOI= 2) expressing T7 polymerase (PLWUV-VacT7: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126, 1986), which had been treated with psoralen under ultraviolet A (365 nm) for 20 minutes. The cells were washed with serum-free MEM. pSeV/F(MMP#6) AM-GFP (alternatively, pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6) \(\Delta M - GFP \) pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNAM-GFP), pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-579, 1996), pGEM/M, and pGEM/F-HN (Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569, 2000; WO 00/70070) plasmids were suspended in Opti-MEM (Gibco-BRL, Rockville, MD) at densities of 12 μ g, 4 μ g, 2 μ g, 4 μ g, 4 μ g, and 4 μ g/dish, respectively. SuperFect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) corresponding to 5 µL per 1 µg DNA was added to the mixture and mixed. After leaving standing at room temperature for 15 minutes, the mixture was ultimately mixed to 3 mL of Opti-MEM comprising 3% FBS, added to the cells, and then cultured. After culturing for five hours, the cells were washed twice with serum-free MEM, and then cultured in MEM containing 40 μ g/mL cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) and 7.5 µg/mL trypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD). After culturing for hours, cells continuously expressing the F

20

25

30

(LLC-MK2/F7/M62/A: Example 12) were layered at $8.5x\ 10^6\ cells/dish$, and cultured for another two days at 37°C in MEM containing 40 $\mu g/mL$ AraC and 7.5 μg/mL trypsin (P0). These cells were collected, and the pellets were suspended in Opti-MEM at 2 mL/dish. After repeating the cycle of freezing and thawing for three times, the lysate was directly transfected to LLC-MK2/F7/M62/A, and the cells were cultured at 32°C in serum-free MEM containing 40 µg/mL AraC, 7.5 µg/mL trypsin, and 50 U/mL type IV collagenase (ICN, Aurola, OH) (only trypsin for pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNΔM-GFP) (P1). Three to 14 days later, a portion of the culture supernatant was collected, infected to freshly prepared LLC-MK2/F7/M62/A, and the cells were cultured at 32°C in serum-free MEM containing 40 μ g/mL AraC, 7.5 μ g/mL trypsin, U/mL type IV collagenase (only trypsin pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNΔM-GFP) (P2). Three to 14 days culture was infected to freshly prepared of the LLC-MK2/F7/M62/A and the cells were cultured for three to seven days at 32°C in serum-free MEM containing 7.5 $\mu g/mL$ trypsin and 50 U/mLtype collagenase (only trypsin for pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HN\DM-GFP) (P3). The culture supernatant was collected, BSA was added thereto at a final concentration of 1%, and stored at -80°C. The stock virus solution was thawed, and used for later production and in vitro experiments.

10

15

20

25

35

As described above, SeV/F(MMP#6) Δ M-GFP in which the F protein cleavage site was modified from PLGMTS (SEQ ID NO: 61) to PQGMTS (SEQ ID NO: 62), SeV(TDK)/Fct14(MMP#6) Δ M-GFP in which 28 amino acids were deleted from the cytoplasmic domain, and SeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HN Δ M-GFP carrying the F/HN chimeric protein were successfully produced.

30 [Example 34] Increase of fusogenic activity in the improved F-modified M-deficient Sendai viral vectors:

In order to investigate the performance of the viruses produced in Example 33, various cancer cell lines having different expression levels of MMP-2 and MMP-9, and LLC-MK2, in which MMP expression is not detected, were infected as described below, and the cell fusiogenicities of the vectors were measured (Fig. 47). Each of the

cancer cells (HT1080, U87MG, A172, U251, SW480, and LLC-MK2) was plated onto a 24-well plate with a media indicated by the supplier to be confluent. U87MG (ATCC No. HTB-14) and A172 (ATCC No. CRL-1620) were purchased from ATCC. U251 (IF050288) was purchased from JCRB tell bank. After washing twice with MEM medium, each of the M-deficient Sendai viral vectors (SeV/AM-GFP) was infected at MOI= 0.1. The cells were left standing at room temperature for one hour and washed with MEM medium, and then 0.5 mL of MEM containing 1% FBS was added to the 24-well plate. After culturing for 48 hours, the number of fused syncytia per X100 visual field (0.3 cm²) of an inverted microscope was counted. Alternatively, the cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde for two hours, transferred to 70% ethanol and then to distilled water, stained for five minutes with hematoxylin, and washed with water to count the number of syncytium-forming nuclei in every 0.3 cm². The results are shown in Fig. 49.

The expression of MMP-2 and MMP-9 was confirmed by gelatin zymography performed in Example 22 (Fig. 48). As a result, expression of MMP-2 in HT1080, U87MG, and A172 was confirmed. Furthermore, low level of MMP-9 expression was confirmed in U251 and SW480. The apparent expression of MMP-2 in LLC-MK2 is due to the activity of MMP-2 in the 1% serum contained in the medium. Two days after infection of each of the cancer cell lines, the spread of GFP was observed. As a result, fusogenic activity was observed in U251 and SW480, which did not show the spread of infection with the conventional $SeV/F(MMP#2)\Delta M-GFP$, infected with improved the F-modified M-deficient Sendai viral vector. In particular, those infected with the M-deficient Sendai viral vector carrying the F/HN chimeric protein (SeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNΔM-GFP) showed fusogenic activity. Although data is not shown, murine Lewis lung carcinoma and murine colon-26 carcinoma as well showed fusogenic activity due to infection with improved M-deficient Sendai viral vectors. The improvement of vector is expected to effect to further enhance the effect and exhibit effect on cancers with low concentration of MMP.

35 <u>Industrial Applicability</u>

10

15

20

The present invention provides vectors that specifically spread

infection in the presence of an objective protease. The vectors of the present invention do not show significant production of virus-like particles, and are transferred to neighboring surrounding cells only by cell fusion. Therefore, the vectors of the present invention are useful for infecting vectors locally to a limited area of the tissue of interest. In particular, the present invention provides vectors that specifically spread their infection to cancer. These vectors have strong inhibitory effects on tumor proliferation. Gene therapy for cancer using the vectors of this invention is very likely to become a novel cancer treatment with little side-effects.

CLAIMS

- 1. A complex comprising a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a nucleic acid encoding an M protein is mutated or deleted, and (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded, said complex further comprising the following properties:
- (1) the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the complex has been introduced;
 - (2) a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and
 - (3) the ability to introduce the RNA into a cell that contacts with the cell transfected with the complex in the presence of the protease.

15

- 2. The complex of claim 1, wherein said complex is a viral particle.
- 3. The complex of claim 2, further comprising the wild-type F protein.
 - 4. The complex of any one of claims 1 to 3, wherein the paramyxovirus is Sendai virus.
- 5. The complex of any one of claims 1 to 4, wherein the protease is a protease whose activity is enhanced in cancer.
 - 6. The complex of any one of claims 1 to 5, wherein the protease is a matrix metalloproteinase or plasminogen activator.
- 7. The complex of any one of claims 1 to 6, wherein the sequence cleaved by the protease comprises Pro-Leu-Gly, Pro-Gln-Gly, or Val-Gly-Arg.
- 8. The complex of any one of claims 1 to 7, wherein a cytoplasmic domain of the wild-type F protein is partially deleted in the modified F protein.

- 9. The complex of any one of claims 1 to 8, wherein the modified F protein is fused with an HN protein.
- 10. A method for producing a viral particle which comprises a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a nucleic acid encoding an M protein is mutated or deleted, and (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded; wherein the viral particle: (1) has the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the viral particle has been introduced; (2) shows a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and (3) has the ability to introduce the genomic RNA into a cell that contacts with the cell transfected with the viral particle comprising the genomic RNA in the presence of the protease; said method comprising the steps of:

10

- (i) amplifying RNP, which comprises the N, P, and L proteins of the paramyxovirus and the genomic RNA, in a cell expressing wild-type M protein of paramyxovirus; and
- (ii) collecting viral particles released into the cell culture 20 supernatant.
- 11. A method for producing a viral particle which comprises a genomic RNA of paramyxovirus wherein (a) a conditionally mutated M protein is encoded, and (b) a modified F protein, whose cleavage site sequence is substituted with a sequence that can be cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein, is encoded; wherein the viral particle: (1) has the ability to replicate the genomic RNA in a cell to which the viral particle has been introduced; (2) shows a significant decrease in or lack of production of viral particles in the intrahost environment; and (3) has the ability to introduce the genomic RNA into a cell that contacts with the cell transfected with the viral particle comprising the genomic RNA in the presence of the protease; said method comprising the steps of:
- (i) amplifying RNP, which comprises the N, P, and L proteins of the paramyxovirus and the genomic RNA, in cells under permissive conditions for the mutant M protein; and

- (ii) collecting viral particles released into the cell culture supernatant.
- 12. The method of claim 10 or 11, wherein step (i) is performed at 35°C or below.
- 13. The method of claim 10 or 11, further comprising the step of presenting the protease that cleaves the modified F protein during at least either of step (i) or (ii); or the step of treating the viral particle collected in step (ii) with the protease.
 - 14. The method of claim 10 or 11, further comprising the steps of expressing the wild-type F protein of paramyxovirus in the cell during step (i); and presenting the protease that cleaves the wild-type F protein during at least either of step (i) or (ii); or the step of treating the viral particle collected in the step (ii) with the protease.
- 15. A therapeutic composition for cancer comprising the complex of claim 5 and a pharmaceutically acceptable carrier.
 - 16. A recombinant modified paramyxoviral F protein comprising Pro-Leu-Gly, Pro-Gln-Gly, or Val-Gly-Arg at the cleavage site, and showing cell fusogenicity in the presence of matrix metalloproteinase or plasminogen activator.
 - 17. A nucleic acid encoding the protein of claim 16.

25

- 18. A viral particle comprising the protein of claim 16 or a nucleic30 acid encoding the protein.
 - 19. A fusion protein having cell fusogenic activity and comprising the transmembrane regions of the paramyxoviral F and HN proteins, wherein the proteins are bound to each other on the cytoplasmic side.
 - 20. The fusion protein of claim 19, wherein the sequence of the

cleavage'site of the protein is substituted with a sequence that is cleaved by a protease that does not cleave the wild-type F protein.

- 21. A nucleic acid encoding the protein of claim 19.
- 22. A vector comprising the nucleic acid of claim 21.
- 23. A viral particle comprising the protein of claim 19 or a nucleic acid encoding the protein.

ABSTRACT

The present invention provides cell fusogenic vectors having replicative ability, whose protease-dependent tropism has been modified. Mgene-deficient viral vectors encoding modified F proteins, in which the cleavage site of the F protein of paramyxovirus is modified to be cleaved by different proteases, were produced. In cells transfected with these vectors, the genomic RNA present in the vectors is replicated, and cell fusogenic infection spreads to neighboring cells depending on the presence of other proteases; however, no viral particles are released. The vectors of this invention, encoding the F proteins which are cleaved by proteases whose activity is enhanced in cancer, show cancer growth suppressive effect in vivo.

(19) 世界知的所有権機関 国際事務局



(43) 国際公開日 2003 年11 月13 日 (13.11.2003)

PCT

(10) 国際公開番号 WO 03/093476 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/45, C07K 14/115, A61K 48/00, 35/76, 45/00, A61P 35/00

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/05528

(22) 国際出願日:

2003 年4 月30 日 (30.04.2003)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-129351 2002 年4 月30 日 (30.04.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 Ibaraki (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 喜納 宏昭 (KINOH,Hiroaki) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市観音台 1 丁目 2 5番 1 1号株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 井上 誠 (INOUE,Makoto) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市観音台 1 丁目 2 5番 1 1号株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 上田泰次(UEDA,Yasuji) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市観音台 1 丁目 2 5番 1 1号株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 飯田 章博 (IIDA,Akihiro) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市観音台 1 丁目 2 5番 1 1号株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 長谷川護 (HASEGAWA,Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856

茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式 会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 小林 雅典 (KOBAYASHI,Masanori) [JP/JP]; 〒520-3322 滋賀県 甲賀郡 甲南町深川 1 4 0 8 – 4 Shiga (JP).

- (74) 代理人: 清水 初志 , 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒 300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1 1 1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP)
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

-- 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: VECTOR WITH MODIFIED PROTEASE-DEPENDENT TROPISM

(54) 発明の名称: プロテアーゼ依存性トロピズムが改変されたベクター

(57) Abstract: It is intended to provide a cell fusion type vector having replicability with modified protease-dependent tropism. An M gene knockout virus vector encoding a modified F protein, in which the cleavage site of a paramyxovirus F protein has been modified into a sequence cleaved by another protease, is produced. When transferred into cells, this vector replicates genomic RNA carried thereby and thus extends the cell fusion type infection toward adjacent cells depending on the latter protease as described above but does not release any viral particles. Such a vector encoding an F protein cleaved by a protease the activity of which is enhanced due to cancer shows an effect of inhibiting caner growth in vivo

(57) 要約: 本発明は、プロテアーゼ依存性トロピズムが改変された複製能を有する細胞融合型ベクターを提供する。パラミクソウイルスのF蛋白質の開裂部位が他のプロテアーゼにより開裂される配列に改変された改変F蛋白質をコードする、M遺伝子欠損型ウイルスベクターを製造した。このベクターは導入された細胞内でベクターに含まれるゲノムRNAを複製し、該他のプロテアーゼの存在に依存して隣接する細胞に細胞融合型の感染を広げるが、ウィルス粒子は放出しない。癌で活性が亢進するプロテアーゼで開裂されるF蛋白質をコードする本発明のベクターは、in vivoで癌増殖抑制作用を示す。

BEST AVAILABLE COPY



明細書

プロテアーゼ依存性トロピズムが改変されたベクター

技術分野

本発明は、プロテアーゼ依存性トロピズムが改変された細胞融合型ベクターおよびその製造方法に関する。本発明のベクターは、癌特異的に感染する遺伝子治療ベクターとして有用である。

背景技術

近年、癌に対する遺伝子治療の開発が進展している。これまで本発明者らはセンダイウイルス(SeV)を用いて遺伝子治療ベクターの開発を行ってきた。SeVはパラミクソウイルス科ウイルスの一種で、非分節型ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウイルスのグループに属す。パラミクソウイルスベクターは、外来遺伝子の高導入率および高発現を可能とするベクターであり、癌の遺伝子治療用ベクターとしても期待されている。パラミスソウイルスによる癌治療の試みは多数なされている。例えば、BHK21細胞にMumps virusを感染させると、担癌ヌードマウスで抗癌効果を示すことが報告された(Minato, N. et al. (1979) J. Exp. Med. 149, 1117-1133)。また、その他のパラミクソウイルスでも同様に抗腫瘍効果が報告されている。最近、Fusogenic proteinの抗癌効果が注目されている。Galanisらは、measles virus のF, HN蛋白質を搭載したadenovirus vectorが、感染した癌細胞がシンシチウムを形成し、in vivoで抗癌効果を報告している(Galanis, E. et al. (2001) Hum. Gene Ther. 12, 811-821)。

言うまでもなく、転移しない癌はその部分を外科的に取り除けばよく、転移することと悪性の癌とは同義であるとされている。その浸潤転移する癌は、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) および/またはプラスミノーゲンアクチベータ

- (uPA, tPA) を高発現することが知られている (Cox, G., and O'Byrne, K.J. (2001) Anticancer Res. 21, 4207-4219; Andreasen, P.A. et al. (2000) Cell Mol. Life. Sci. 57, 25-40)。その理由として、癌細胞が転移浸潤する際、そのまわりにある細胞外マトリックス (ECM) が障壁となり細胞の移動ができないので、癌はそのECMを分解する酵素 (MMP, uPA, tPA) を発現し、ECM分解することによってはじめて、浸潤、転移が可能になるためであると考えられている。

一方、癌遺伝子治療の問題点として3つのことがあげられている。第一に癌細胞への導入効率が低かったり、固形癌深部への導入ができないため、癌全体への導入ができず、残った癌が再び増殖を始め再発することである。第二に癌への導入と同時に正常細胞へも導入され、正常細胞にも傷害を与え、副作用が大きくなっていることである。第三にこれは癌治療全体の問題でもあるが、癌の悪性化にともなう浸潤転移である。これらの問題を解決するベクターは未だ開発されていない。

発明の開示

本発明は、プロテアーゼ依存性トロピズムが改変され、特定のプロテアーゼ存在下でのみ周囲の細胞に浸潤する新たな細胞融合型ベクターおよびその製造方法を提供する。

センダイウイルスを含むパラミクソウイルス科ウイルスは、そのエンベロープに2つの蛋白を有している。F (fusion) 蛋白質はウイルスとその宿主である細胞とを膜融合をさせ、ヌクレオカプシドを細胞質へ放出させる。HN (hemagglutinin-neuraminidase) 蛋白質は赤血球凝集能とのノイラミナーゼ活性をもち、宿主レセプターへ結合する役割を果たす。F蛋白質およびHN蛋白質はスパイク蛋白質とも呼ばれ、ウイルスのエンベロープ表面に露出している。またM (matrix) 蛋白質はエンベロープを裏打ちし、ウイルス粒子に強固さを付与している。このベクターの特徴は広範な細胞と動物組織に高効率で遺伝子導入可能で、かつ既存のベクタ

ーと比較し、高い発現量を実現していることである。

F蛋白質(F0)はそのままでは細胞融合活性を示さず、宿主由来のプロテアーゼにより開裂してF1とF2に分解されることによってはじめてその融合活性を示すようになる。従って、野生型のF蛋白質を持つウイルスの増殖は、この蛋白質を開裂できるtrypsin様のプロテアーゼを発現する気道粘膜上皮などの組織に制限されてしまう。パラミクソウイルスではFの改変による感染のトロピズムもしくは融合能の改変についての様々な研究がなされている。SeVでは、 α -キモトリプシンでのみ開裂するFを持つ変異体がトリプシン感受性を失い、そのトロピズムがFの開裂配列特異的に変わることが示されている(Tashiro, M. et al. (1992) J. Gen. Virol. 73(Pt 6),1575-1579)。Newcastle disease virus、Measles virusでは、Fの開裂配列を改変し、そのシンシチウム形成能がトリプシン依存的に変わることを示している(Li, Z. et al. (1998) J. Virol. 72,3789-3795;Maisner,A. et al. (2000) J. Gen. Virol. 81,441-449)。

このように、Fの開裂配列を改変することにより、あるプロテアーゼを発現する特定の組織等にベクターを感染および増殖させることが可能となると考えられる。しかし、パラミクソウイルスベクターが持つ問題点の1つに、標的細胞へのベクター導入後に起こる細胞からのウィルスの2次放出がある。複製型ウィルスを感染させた細胞ではビリオンが形成され娘ウィルスが放出されるため、標的組織以外にもウイルス粒子が拡散する。上述のように野生型F蛋白質を持つウイルス粒子はトリプシン様酵素の非存在下では感染性を示さないものの、ウイルス粒子自身は細胞から放出される。生体内投与においては、血中に拡散したウイルスが全身に到達することも懸念される。さらに、複製能を持たないF遺伝子欠損SeV(Li, H.O. et al. (2000) J. Virol. 74, 6564-6569; W000/70055; W000/70070) を導入した細胞等からもウィルス様粒子 (VLP: virus like particle) の放出が観察されている。このような2次放出粒子は、標的とする組織以外への感染や免疫反応を誘発することが懸念される。

本発明者らは、ウイルスエンベロープ遺伝子の中で、M遺伝子を欠損するパラミクソウイルスは、粒子形成が起こらないが感染細胞とそれに接した細胞が融合することによってシンシチウムを形成し、細胞融合型の感染をすることを見出している(WOOO/09700)。これらのM欠損型ウイルスは、導入細胞において複製され、トリプシン存在下で隣接する細胞に伝達される。しかしながら、この現象はFが開裂して活性化する条件においてのみ起こる現象であり、野生型F蛋白質を持つウイルスではtrypsin様のプロテアーゼがない状態ではウイルスの伝達は起きない。本発明者らは、このM欠損型ウイルスにおいてF蛋白質のトロピズムを改変すれば、2次放出粒子を産生せず、特定の組織でのみ感染を広げられる新規なベクターを開発できるのではないかと考えた。特に浸潤転移癌においては、ECMを分解するMMP、uPA、tPAなどのプロテアーゼ活性が亢進しているものが多く知られている。そこで本発明者らは、このM欠失型SeVのプロテアーゼ依存的細胞融合型感染と癌におけるMMP、uPA、tPA高発現の現象を組み合わせて利用し、浸潤転移癌特異的に感染し広がってゆくSeVベクターを作製した。

M欠損型ウイルスは粒子形成に必要なM遺伝子を欠損しているため、通常ウイルス粒子は放出しないか極度に抑制されている。複製能を持つ組み換えウイルスの産生に用いる通常の再構成法(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)を用いた場合、M欠損型ウイルスのRNPを調製することはできるが感染性ウイルス粒子は製造できない(W000/09700)。実際の癌治療薬としてM欠失型ベクターを利用するためには、M欠失型ウイルスを感染性ウイルス粒子として調製できれば極めて有用である。そこで本発明者らは、M欠失型ウイルスをウイルス粒子として調製できれば極めて有用である。そこで本発明者らは、M欠失型ウイルスをウイルス粒子として調製するための新たな製造方法の開発を行った。

本発明者らはまず、VLP放出が抑制されたベクターを構築するための一つの解決 法として、ウィルス遺伝子の温度感受性変異の利用を考えた。低温で生育するが 高温では増殖できない幾つかの変異型ウィルスが報告されている。本発明者らは 、特に高温でのビリオン形成が抑制されるような変異蛋白質、特にM蛋白に変異を

有するものを利用すれば、低温で(例えば32℃)ウィルス生産を行い、遺伝子治 療等の実応用時はそれよりは高温(例えば37℃)で行うことにより、VLP形成を抑 制できる可能性があると考えた。この目的のために、本発明者らはM蛋白質および HN蛋白質で報告されている、それぞれ3つ、計6つの温度感受性変異を持つ変異M およびHN蛋白質をコードするF遺伝子欠損型の組み換えセンダイウィルスベクター を構築した。このウィルスのVLP放出を調べたところ、野生型ウィルスに比べ約1/ 10またはそれ以下であることが判明した。さらに、VLP放出が抑制されたセンダイ ウィルスベクターを導入した細胞におけるM蛋白質の局在を、抗M抗体を利用した 免疫染色により解析した結果、野生型ウィルスを導入した細胞では見られる細胞 表面のM蛋白質の凝集が、VLP放出抑制型ウィルスの場合は有意に減少しており、 特に高温(38℃)においてM蛋白の濃縮像が極端に減少していた。温度感受性変異 M遺伝子を含むこのSeVを感染させた細胞におけるM蛋白質およびHN蛋白質の細胞内 局在を共焦点レーザー顕微鏡により詳しく調べたところ、低温 (32℃) において も細胞表面でのM蛋白の局在は有意に低下しており、微小管 (microtubule) の形 態に近い形で観察された。さらに、髙温(37℃)ではM蛋白は微小管の中心体付近 (すなわちゴルジ体付近)に局在して存在していた。微小管脱重合剤を添加する と、温度感受性M遺伝子を持つSeVのみならず、野生型M遺伝子を持つSeVにおいて も、M蛋白質の局在構造が破壊されたことから、M蛋白質は実際に微小管に沿って 局在して機能している可能性が高いと判断された。以上の知見から、温度感受性 変異導入ウィルスで二次放出粒子が減少しているのは、粒子形成の中心的な役割 を担っていると考えられているM蛋白の細胞内局在の不全であると断定された。従 って、M蛋白質の正常な細胞内局在を妨げることにより、VLPの形成を効果的に抑 制することができると考えられる。また、M蛋白質の機能には微小管との相互作用 が重要であり、例えばM蛋白質がゴルジ体から微小管に沿って細胞内移動すること を阻害するような遺伝子変異や薬剤を開発することにより、M蛋白の細胞内局在の 不具合を生じさせ、結果的に二次放出粒子の減少を達成することが可能と判断さ

れる。すなわち本発明者らは、M蛋白質の局在に欠陥を生じさせるような変異を有するウィルスベクターを調製することによって、粒子形成能が低下または消失した組み換えウィルスベクターを得ることができることを見出した。

また本発明者らは、M遺伝子をウィルスから欠失させることによって、ウィルスを導入した細胞におけるM蛋白質の細胞表面の凝集が完全に欠如したウィルスの構築を試みた。この目的のために、本発明者らはM遺伝子欠失型ウィルスの生産に利用可能な野生型M蛋白質を誘導的に発現させることができるヘルパー細胞を構築した。この細胞を利用することにより、野生型M蛋白質を含むエンベロープに、F改変型のM遺伝子欠損ウイルスのRNPが包まれたウイルス粒子を回収することに初めて成功した。本発明の方法により1×10°PFU/ml以上の濃度でウイルス粒子を製造することが可能となり、臨床を含む実用に耐える組み換えウイルスを初めて提供することが可能となった。また本発明のウイルス製造系は、他のウィルスの混入を否定できる安全性の高い高タイターの遺伝子治療用ベクターの生産を可能にする。M発現細胞を利用してM蛋白質をトランスに供給する、本発明のM欠失型SeV生産システムにおいて初めて、実用に適したF改変型M欠失型のパラミクソウィルスが提供された。

本発明者らは、上記のように構築した感染性ウイルス粒子を用いて、実際の抗腫瘍効果をin vivoにおいて検証した。癌細胞を移植したマウスに対して、この癌で活性が亢進するマトリクスメタロプロテアーゼ (MMP)で活性化されるM欠失型ウイルスを投与したところ、細胞融合型の感染を通して癌組織内にウイルスが広がることが確認された。野生型ウイルスを投与した癌では、数日後でもウイルスは注入部位に限定されていたのに対し、本発明のベクターでは癌組織に対して強い浸透力を示し、癌全体にベクターの広がりが認められた。ウイルス未投与または野生型ウイルスを投与した対照に比べ、癌の増殖に対する抑制効果は明白であった。これまでにもレトロウイルスにおいてMMP発現細胞を標的とするベクターが作製されているが (Peng, K.-W. et al., 1997, Human Gene Therapy 8:729-738; P

eng, K.-W. et al., 1999, Gene Therapy 6:1552-1557; Martin, F. et al., 199 9, J. Virol. 73:6923-6929)、本発明とは認識配列のデザインが全く異なっている。また、これらの報告は癌組織への特異的な感染、則ちターゲッティングのみを目的としたものであり、癌組織で特異的に(細胞間で)感染が広がり治療効果を発揮するベクターは本発明において初めて提供された。

さらに本発明者らは、ウイルス粒子産生時にプロテアーゼの添加を制御することにより、ウイルス表面のF蛋白質が開裂されていないウイルス粒子 (F非開裂型ウイルス) を調製することに成功した。このウイルスは、そのままでは感染性を持たないが、ウイルス表面のF蛋白質を開裂するプロテアーゼで処理するか、あるいは該プロテアーゼ存在条件下で細胞に添加することにより、特異的に感染能を示すことができた。このような潜在感染型ウイルスベクターにより、特定のプロテアーゼを産生する癌細胞に特異的にベクターを感染させることが可能となった

また本発明者らは、改変F遺伝子を持つベクターを、野生型F蛋白質を用いて作製することにより、ベクター作製時に野生型F蛋白質を開裂するプロテアーゼを用いてウイルス粒子を製造する方法を開発した。この方法によれば、野生型F蛋白質を発現するヘルパー細胞を用いて、トリプシン等の野生型F蛋白質を開裂する酵素によりウイルス増幅を行うことができる。得られたウイルス粒子は、開裂した野生型F蛋白質をエンベロープに含み感染性を有するが、ウイルスゲノムはF蛋白質の開裂部位が改変された改変F遺伝子をコードするため、特定のプロテアーゼの存在下でしか感染を広げられない。野生型F蛋白質を用いてウイルスを調製する方法は、ベクターゲノムに組み込む改変F遺伝子に依存せずにウイルス粒子を製造することが可能であるため有利である。

このように本発明は、癌などの特定の組織で発現するプロテアーゼ存在下での み感染を広げるベクターを提供する。本発明のベクターはウイルス様粒子を有意 に産生せず、細胞融合により隣接する周囲の細胞にベクターを伝達する。特に癌

で活性が亢進するプロテアーゼで感染性を獲得する本発明のベクターは、腫瘍増殖に対する強い抑制作用を持っており、このベクターを用いた癌の遺伝子治療は極めて有効と考えられる。

すなわち本発明は、プロテアーゼ依存性トロピズムが改変された細胞融合型ベクターおよびその製造方法等に関し、より具体的には

- [1] パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a) M蛋白質をコードする核酸が変異または欠失しており、かつ(b) 改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを含む複合体であり、以下の性質を有する複合体、
 - (1) 該複合体が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有する、
- (2) 宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失している、
- (3) 該プロテアーゼの存在に依存して、該複合体が導入された細胞と接触する細胞に、該RNAを導入する能力を有する、
- [2] ウイルス粒子である、[1] に記載の複合体、
- [3] 野生型F蛋白質をさらに含む、[2] に記載の複合体、
- 〔4〕該パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の複合体、
- [5] 該プロテアーゼが、癌で活性が亢進するプロテアーゼである、[1] から
- [4] のいずれかに記載の複合体、
- [6] 該プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテアーゼまたはプラスミノー ゲンアクチベーターである、[1] から [5] のいずれかに記載の複合体、
- [7] 該プロテアーゼによって開裂される配列が、Pro-Leu-Gly、Pro-Gln-Gly、またはVal-Gly-Argを含む、[1] から [6] のいずれかに記載の複合体、
- [8] 該改変F蛋白質において、野生型F蛋白質が持つ細胞質ドメインの一部が欠

失している、[1]から[7]のいずれかに記載の複合体、

- [9] 該改変F蛋白質がHN蛋白質と融合している、[1] から[8] のいずれかに 記載の複合体、
- [10] パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a) M蛋白質をコードする 核酸が変異または欠失しており、かつ(b) 改変F蛋白質であって、該蛋白質の開 裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配 列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを有するウイルス粒子であって、(
- 1) 該ウイルス粒子が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有し、 (
- 2) 宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失しており、
- (3) 該プロテアーゼの存在に依存して、該ゲノムRNAを有するウイルス粒子が導入された細胞と接触する細胞に、該ゲノムRNAを導入する能力を有するウイルス粒子の製造方法であって、
- (i) パラミクソウイルスの野生型M蛋白質を発現する細胞において、該パラミクソウイルスのN、P、およびL蛋白質、および該ゲノムRNAを含むRNPを増幅させる工程、
- (ii) 該細胞の培養上清に放出されたウイルス粒子を回収する工程、を含む方法、
- [11] パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a)条件的変異を有するM 蛋白質をコードし、かつ(b)改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを有するウイルス粒子であって、(1)該ウイルス粒子が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有し、(2)宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失しており、(3)該プロテアーゼの存在に依存して、該ゲノムRNAを有するウイルス粒子が導入された細胞と接触する細胞に、該ゲノムRNAを導入する能力を有するウイルス粒子の製造方法であって、

- (i) 該M変異蛋白質の許容条件下、細胞内で該パラミクソウイルスのN、P、およびL蛋白質、および該ゲノムRNAを含むRNPを増幅させる工程
- (ii) 該細胞の培養上清に放出されたウイルス粒子を回収する工程、を含む方法、
 - [12] 工程(i) を35℃以下で行う、[10] または[11] に記載の方法、
- [13] 工程(i) ~ (ii) の少なくともいずれかの時期において該改変F蛋白質を開裂させるプロテアーゼを存在させるか、あるいは工程(ii) において回収されたウイルス粒子を該プロテアーゼで処理する工程を含む、[10] または[11] に記載の製造方法、
- [14] 工程(i) において該細胞内でパラミクソウイルスの野生型F蛋白質を発現させ、工程(i) ~ (ii) の少なくともいずれかの時期に該野生型F蛋白質を開裂するプロテアーゼを存在させるか、あるいは工程(ii) において回収されたウイルス粒子を該プロテアーゼで処理する工程を含む、[10] または[11] に記載の製造方法、
- [15] [5] に記載の複合体および薬学的に許容される担体を含む癌の治療組成物、
- [16] パラミクソウイルスF蛋白質の改変蛋白質であって、開裂部位にPro-Leu-Gly、Pro-Gln-Gly、またはVal-Gly-Argを含み、マトリックスメタロプロテアーゼまたはプラスミノーゲンアクチベーターの存在下で細胞融合能を示す組み換え蛋白質、
- 〔17〕〔16〕に記載の蛋白質をコードする核酸、
- [18] [16] に記載の蛋白質または該蛋白質をコードする核酸を含むウイルス粒子、
- 〔19〕パラミクソウイルスF蛋白質およびHN蛋白質の膜貫通領域を持ち、細胞質側において互いの蛋白質が結合している融合蛋白質であって、細胞融合活性を持つ蛋白質、

- [20] [19] に記載の融合蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、 野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋 白質、
 - [21] [19] に記載の蛋白質をコードする核酸、
 - [22] [21] に記載の核酸を含むベクター、
- [23] [19] に記載の蛋白質または該蛋白質をコードする核酸を含むウイルス粒子、に関する。

本発明においてパラミクソウィルスとはパラミクソウィルス科(Paramyxovirid ae) に属するウィルスまたはその誘導体を指す。パラミクソウィルスは、非分節 型ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウィルスのグループの1つで、パラミクソウイ ルス亜科 (Paramyxovirinae). (パラミクソウイルス属 (レスピロウイルス属とも 言う)、ルブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む)およびニューモ ウイルス亜科 (Pneumovirinae) (ニューモウイルス属およびメタニューモウイル ス属を含む)を含む。本発明を適用可能なパラミクソウィルスとしては、具体的 にはセンダイウィルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウィルス(Newcastle di sease virus)、おたふくかぜウィルス(Mumps virus)、麻疹ウィルス(Measles vir us)、RSウィルス(Respiratory syncytial virus)、牛疫ウィルス(rinderpest vir us)、ジステンパーウィルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウィル ス (SV5)、ヒトパラインフルエンザウィルス1, 2, 3型等が挙げられる。より具 体的には、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1) , human parainfluenza virus-3 (HPIV-3), , phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CDV), dolphin molbillivirus (DMV), peste-des-peti ts-ruminants virus (PDPR), measles virus (MV), rinderpest virus (RPV), He ndra virus (Hendra), Nipah virus (Nipah), human parainfluenza virus-2 (HP IV-2), simian parainfluenza virus 5 (SV5), human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、お

よびNewcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV), human parainfluenza virus-1 (HPIV-1), human parainfluenza vi rus-3 (HPIV-3), phocine distemper virus (PDV), canine distemper virus (CD V), dolphin molbillivirus (DMV), peste-des-petits-ruminants virus (PDPR) 、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、およ び Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが例示できる。本発 明のウィルスは、好ましくはパラミクソウイルス亜科(レスピロウイルス属、ル ブラウイルス属、およびモービリウイルス属を含む) に属するウイルスまたはそ の誘導体であり、より好ましくはレスピロウィルス属(Respirovirus) (パラミ クソウィルス属 (Paramyxovirus) とも言う) に属するウィルスまたはその誘導体 である。本発明を適用可能なレスピロウィルス属ウィルスとしては、例えばヒト パラインフルエンザウィルス1型 (HPIV-1)、ヒトパラインフルエンザウィルス 3型(HPIV-3)、ウシパラインフルエンザウィルス3型(BPIV-3)、センダイウィ ルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウィルス1型とも呼ばれる)、お よびサルパラインフルエンザウィルス10型(SPIV-10)などが含まれる。本発明に おいてパラミクソウィルスは、最も好ましくはセンダイウィルスである。これら のウィルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築され ·た株などに由来してもよい。

組み換え蛋白質および組み換えウイルスとは、それぞれ組み換えポリヌクレオチドを介して生成した蛋白質およびウイルスを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人の手によってポリヌクレオチド鎖がつなぎ替えられたり、あるいは合成されたポリヌクレオチドなどが含まれる。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換え蛋白質は、蛋白質をコードする組み換えポリヌクレオチドを発現さ

せることにより生産することができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により 構築されたウィルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルス を再構築することによって生成することができる。

本発明において遺伝子とは遺伝物質を指し、RNAおよびDNA等の核酸が含まれる。本発明において蛋白質をコードする核酸は、該蛋白質の遺伝子と呼ぶ。また遺伝子は蛋白質をコードしていなくてもよく、例えば遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。また蛋白質をコードするとは、ポリヌクレオチドが該蛋白質を適当な条件下で発現できるように、該蛋白質のアミノ酸配列をコードするORFをセンスまたはアンチセンスに含むことを言う。

本発明は、プロテアーゼ依存性トロピズムが改変された複製能を有する細胞融合型ベクターを提供する。このベクターは、宿主内環境において細胞への導入後にウイルス様粒子を有意に放出せず、特定のプロテアーゼ存在下でのみ周囲の細胞に浸潤するベクターである。本発明のベクターは、具体的には以下の複合体を言う。

パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a) M蛋白質をコードする核酸が変異または欠失しており、かつ(b) 改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを含む複合体であり、以下の性質を有する複合体。

- (1) 該複合体が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有する。
- (2) 宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失している
- (3) 該プロテアーゼの存在に依存して、該複合体が導入された細胞と接触する 細胞に、該RNAを導入する能力を有する。この複合体は、ゲノムRNAを複製しそれ

を隣接細胞に導入する働きを有することから、本発明においてベクターとも呼ぶ 。ベクターとは、核酸を細胞に導入する担体を言う。

上記複合体は、具体的には該パラミクソウイルスのゲノムRNAとこれに結合するウイルス蛋白質を含む複合体である。本発明の複合体は、例えばパラミクソウイルスのゲノムRNAとウイルス蛋白質からなる複合体、すなわちリボヌクレオプロテイン (RNP) であってよい。RNPは、例えば所望のトランスフェクション試薬と組み合わせて細胞に導入することができる。このようなRNPは、具体的にはパラミクソウイルスのゲノムRNA、N蛋白質、P蛋白質、およびL蛋白質を含む複合体である。RNPは細胞内に導入されると、ウイルス蛋白質の働きによりゲノムRNAからウイルス蛋白質をコードするシストロンが転写されると共に、ゲノム自身が複製され娘RNPが形成される。ゲノムRNAの複製は、該RNAのコピー数の増加をRT-PCRまたはノーザンハイブリダイゼーション等により検出することにより確認することができる。

また上記複合体は、より好ましくはパラミクソウイルスのウイルス粒子である。ウイルス粒子とは、ウイルス蛋白質の働きにより細胞から放出される、核酸を含む微小粒子を言う。ウイルス粒子の形状はウイルスの種類により球状、棍棒状など様々であってよいが、細胞より十分に小さく、その大きさは通常10nm~800nm程度である。パラミクソウイルスのウイルス粒子は、ゲノムRNAとウイルス蛋白質を含む上記RNPが細胞膜由来の脂質膜(エンベロープという)に含まれた構造をしている。ウイルス粒子は、感染性を示すものでも示さないものでもよい(後述)。例えば、そのままでは感染性を示さないが、特定の処理により感染性を獲得するような潜在的に感染性を有するウイルス粒子であってもよい。

またパラミクソウイルスのゲノムRNAとは、パラミクソウイルスのウイルス蛋白質と共にRNPを形成し、該蛋白質によりゲノム中の遺伝子が発現し、該核酸が複製して娘RNPが形成される機能を持つRNAを言う。パラミクソウイルスは一本鎖ネガティブ鎖RNAをゲノムに持つウイルスであるので、このようなRNAは搭載遺伝子を

アンチセンスとしてコードしている。一般にパラミクソウィルスのゲノムは、3' リーダー領域と5'トレイラー領域の間に、ウイルス遺伝子がアンチセンスとして 並んだ構成をしている。各遺伝子のORFの間には、転写終結配列(E配列)-介在配 列(I配列)-転写開始配列(S配列)が存在し、これにより各遺伝子のORFをコー ドするRNAが別々のシストロンとして転写される。本発明のベクターに含まれるゲ ノムRNAは、該RNAにコードされる遺伝子群の発現およびRNA自身の自律的な複製に 必要なウイルス蛋白質である N (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、およびL (ラージ)をアンチセンスにコードしている。また該RNAは、隣接紬胞への該RNA の伝播に必要な細胞膜融合を起こす蛋白質であるF(フュージョン)蛋白質をアン チセンスにコードしている。好ましくは、ゲノムRNAはさらにHN (ヘマグルチニ ン-ノイラミニダーゼ) (またはH) 蛋白質をアンチセンスにコードしている。但 し、ある種の細胞では感染にHN蛋白質は必要なく(Markwell, M.A. et al., Proc . Natil. Acad. Sci. USA 82(4):978-982 (1985)) 、F蛋白質のみで感染が成立す る。また、細胞に結合し得るHN以外の蛋白質をF蛋白質と組み合わせてベクターを 感染させることができる。従って、HN遺伝子をコードしないゲノムRNAを用いても 、本発明のベクターを構築することは可能である。

例えばパラミクソウィルス亜科に属する各ウィルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、N遺伝子は"NP"と表記されることもある。

レスピロウィルス属 NP P/C/V M F HN ルブラウィルス属 NPP/V HN (SH) モービリウィルス属 NP P/C/V M H

例えばパラミクソウィルス科 (*Paramyxoviridae*) のレスピロウィルス (Respir ovirus) に分類されるセンダイウィルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218、P遺伝子については M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M遺伝子については D11446, K02742

, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056、F遺伝子について は D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152 , XO2131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M690 46, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30 204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードする ウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV, AF014953; DMV, X75961 ; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X6831 1; SeV, X00087; SV5, M81442; および Tupaia, AF079780、P遺伝子については、 CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975 ; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; R PV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; および Tupaia, AF079780、C遺伝子 については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1. M74081; HPIV-3, D00047; MV , ABO16162; RPV, X68311; SeV, ABO05796; および Tupaia, AF079780、M遺伝子 については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; およ び SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1. M223 47; HPIV-2, M60182; HPIV-3. X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mum ps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV , M21514; SeV, D17334; および SV5, ABO21962、HN (HまたはG) 遺伝子について ti CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2. D000865; HPIV-3 , AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711 ; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876 が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られてお り、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。

これらのウイルス蛋白質のORFは、ゲノムRNAにおいて上記のE-I-S配列を介して アンチセンスに配置される。ゲノムRNAにおいて最も3'に近いORFは、3'リーダー 領域と該ORFとの間にS配列のみが必要であり、EおよびI配列は必要ない。またゲ ノムRNAにおいて最も5'に近いORFは、5'トレイラー領域と該ORFとの間にE配列の みが必要であり、IおよびS配列は必要ない。また2つのORFは、例えばIRES等の配 列を用いて同一シストロンとして転写させることも可能である。このような場合 は、これら2つのORFの間にはE-I-S配列は必要ない。野生型のパラミクソウイルス の場合、典型的なRNAゲノムは、3'リーダー領域に続き、N、P、M、F、HN、および L蛋白質をアンチセンスにコードする6つのORFが順に並んでおり、それに続いて5 'トレイラー領域を他端に有する。本発明のゲノムRNAにおいては、ウイルス遺伝 子の配置はこれに限定されるものではないが、好ましくは、野生型ウイルスと同 様に、3'リーダー領域に続き、N、P、(M、)F、HN、およびL蛋白質をコードする ORFが順に並び、それに続いて5'トレイラー領域が配置されることが好ましい。あ る種のパラミクソウイルスにおいては、ウイルス遺伝子は6つではないが、そのよ うな場合でも上記と同様に各ウイルス遺伝子を野生型と同様の配置とするか、あ るいは適宜変更することができる。M蛋白質のORFについては後述するが、本発明 のベクターの1つの態様においては、このORFは存在しないか、あるいは変異M蛋 白質をコードしている。また本発明のベクターの1つの態様においては、ゲノム にコードされるF蛋白質の開裂部位は、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼ によって開裂される配列に改変されている(後述)。本発明のゲノムRNAは、1つ またはそれ以上の外来遺伝子をコードすることができる。外来遺伝子としては、 標的とする細胞において発現させたい所望の遺伝子を用いることができる。外来 遺伝子の導入位置は、例えばゲノムの蛋白質非コード領域の所望の部位に挿入す ることができ、例えば3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、 各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'ト レイラー領域の間に挿入することができる。M遺伝子を欠失するゲノムでは、その

欠失領域に挿入することができる。パラミクソウイルスに外来遺伝子を導入する場合は、ゲノムへの挿入断片のポリヌクレオチドの鎖長が6の倍数となるように挿入することが望ましい(Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 4822-4830, 1993)。挿入した外来遺伝子とウイルスORFとの間には、E-I-S配列が構成されるようにする。あるいは、IRESを介して外来遺伝子を挿入してもよい。

外来遺伝子の発現レベルは、その遺伝子の上流(ネガティブ鎖の3'側)に付加する転写開始配列の種類により調節することができる(W001/18223)。また、ゲノム上の外来遺伝子の挿入位置によって制御することができ、ネガティブ鎖の3'の近くに挿入するほど発現レベルが高く、5'の近くに挿入するほど発現レベルが低くなる。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウィルス蛋白質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。一般に、外来遺伝子は高い発現が得られることが有利と考えられるため、外来遺伝子は、効率の高い転写開始配列に連結し、ネガティブ鎖ゲノムの3'端近くに挿入することが好ましい。具体的には、3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質のRFとの間に挿入される。あるいは、3'に一番近いウイルス遺伝子と2番目の遺伝子のORFの間に挿入してもよい。逆に、導入遺伝子の高発現が望ましくない場合は、例えばベクターにおける挿入遺伝子の挿入位置をネガティブ鎖ゲノムのなるべく5'側に設定したり、転写開始配列を効率の低いものにするなどして、ウィルスベクターからの発現レベルを低く抑えることで適切な効果が得られるようにすることも可能である。

また本発明のベクターは、例えばウィルス蛋白質による免疫原性を低下させるために、またはRNAの転写効率や複製効率を高めるために、ベクターに含まれる任意のウィルス遺伝子が野生型遺伝子から改変されていてよい。具体的には、例えばパラミクソウィルスベクターにおいては、複製因子であるN、P、およびL遺伝子の中の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグル

チニン(hemagglutinin)活性とノイラミニダーゼ(neuraminidase)活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウィルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、F蛋白質も、開裂部位以外のドメインも改変することにより、膜融合能および/または粒子形成能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用してこれらの蛋白質に関する抗原提示能を弱めたウィルスベクターを作製することもできる。

また本発明のベクターにおいては、アクセサリー遺伝子が欠損したものであってよい。例えばSeVのアクセサリー遺伝子の1つであるV遺伝子をノックアウトすることにより、培養細胞における遺伝子発現や複製は障害されることなく、マウス等の宿主に対するSeVの病原性が顕著に減少する(Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Curran, J. et al., W001/04272, EP1067179)。このような弱毒化ベクターは、in vivo またはex vivoにおける毒性のない遺伝子導入用ウィルスベクターとして有用である

また好ましい態様において、本発明の複合体は実質的に均一な複合体である。 実質的に均一な複合体とは、該複合体が、本発明の複合体ではないパラミクソウイルスのRNPまたはウイルス粒子から分離されていることを言う。すなわち実質的に均一な本発明の複合体は、粒子形成能を有する他のパラミクソウイルスRNPも該ウイルスのウイルス粒子も含んでいない。ここで粒子形成能とは、ウイルスベクターを感染させた細胞において、感染性ウイルス粒子および/または非感染性ウイルス粒子(これをウイルス様粒子という)を放出(これを2次放出という)するベクターの能力を言う。また、F蛋白質の開裂部位が改変された本発明の複合体においては、野生型F蛋白質またはこれと同等の融合活性を有するF蛋白質をコードする遺伝子をゲノムに含むウイルスRNPも該ゲノムを含むウイルス粒子も含んでい ない。

本発明の一態様においては、上記ゲノムRNAにコードされるF蛋白質は、該蛋白質の開裂部位の配列が、他のプロテアーゼによって開裂される配列に置換されている。パラミクソウイルスのF蛋白質(FO)は、そのままでは細胞膜融合活性を示さないが、FO断片の細胞外ドメイン(またはウイルス粒子外ドメイン)が開裂することによってその融合活性を示すようになる。開裂により生じた2つのF蛋白質断片はN末側がF2、およびC末側がF1と呼ばれ両者はジスルフィド結合により結合している。F蛋白質を開裂するとは、このように膜上のF蛋白質を膜の外側のドメインにおいて切断し、細胞融合能を獲得させるような断片を生じさせることを言う。開裂部位の配列とは、プロテアーゼによる開裂のために必要なアミノ酸配列またはその中の本質的な残基を言う。パラミクソウイルスのF蛋白質の開裂部位は知られており、それらは細胞内のfurin等のトリプシン様プロテアーゼにより切断される。

furinは、ほとんどの細胞のゴルジ体に普遍的に存在する。furinの認識モチーフは、Arg-X-Lys/Arg-Arg (RXK/RR) ("/"で区切られた2つのアミノ酸はどちらかであることを表す)である。病原性の高い、Human PIV3 (RTKR)、SV5 (RRRR)、Mumps virus (RHKR)、NDV (virulent strain)強毒株 (RQR/KR)、Measles virus (RHKR)、RS virus (RKRR)などは開裂部位にこれらのモチーフの配列を持っている。強毒株のFは、すべての細胞に存在するプロテアーゼに感受性をもち、どの臓器でもFの開裂を伴って多段階増殖するため、感染が致命的になってしまう。一方、病原性の低い、Sendai virus (PQSR)、Human PIV1 (PQSR)、NDV (avirulent strain)弱毒株 (K/RQG/SR)ではこのモチーフに当てはまらず、セリンプロテアーゼ認識配列であるArgのみ持っている。パラミクソウイルスのF蛋白質開裂部位の配列はよく解析されており、当業者であれば適宜文献を参照して知ることができる(例えばウイルス学、畑中正一編集、東京、朝倉書店、1997、pp. 247-248を参照)。

また開裂部位は、当該パラミクソウイルスが増殖可能な細胞、組織、または個体等で増殖させたウイルスのF蛋白質、あるいは該細胞または個体等でF蛋白質を発現させ回収したF蛋白質の開裂部位を同定することにより確認することができる。また、細胞表面に発現するF蛋白質を、この蛋白質の開裂部位を開裂するトリプシン等のプロテアーゼで処理することにより、人為的にF蛋白質を開裂させ同定することもできる。本発明の一態様においてF蛋白質は、F蛋白質開裂部位のアミノ酸配列が改変され、他のプロテアーゼにより開裂されるような配列となっている。このためには、F蛋白質の生来の開裂配列を、1またはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失、および/または挿入により改変し、他のプロテアーゼにより開裂されるような配列に再構築する。アミノ酸配列の改変は、公知の部位特異的変異導入法により行うことができる。なお、改変F蛋白質は、野生型F蛋白質を開裂するプロテアーゼ(トリプシン等)により開裂される性質が維持されていてもよい(実施例参照)。このような改変F蛋白質をコードするベクターは、プロテアーゼ依存性トロピズムが野生型F蛋白質に比べて拡大される。

他のプロテアーゼにより開裂される配列としては、所望のプロテアーゼにより開裂される配列であってよく、例えばベクター導入の標的としたい所望の組織または細胞で発現されるプロテアーゼにより開裂される配列を用いることができる(W001/20989)。このように標的組織で活性があるプロテアーゼで開裂される配列を持つF蛋白質遺伝子を用いてベクターを設計することにより、このプロテアーゼ活性が存在する環境下で特異的に周囲の細胞にベクターを増幅し伝達するという優れた性質を実現させることができる。例えば、ある組織で特異的に発現または活性化されるプロテアーゼの切断配列を利用すれば、該組織内でのみ特異的に浸潤するベクターを構築することができる。また、ある状態、例えばある疾患で特異的に発現または活性化するプロテアーゼの切断配列を利用すれば、その状態でのみ(例えば特定の疾患領域内でのみ)特異的に浸潤するベクターを構築することができる。プロテアーゼは細胞内または細胞外に存在するものであってよく

、例えば細胞外に分泌されるプロテアーゼや、膜表面に発現する膜型プロテアーゼなどが好適である。また、F蛋白質が細胞内において翻訳され、細胞表面に分泌されるまでの輸送経路上に存在する所望のプロテアーゼであってよい。

プロテアーゼ遺伝子の発現異常によって生じる疾患の数は膨大で、代謝性疾患、循環障害、炎症・免疫疾患、感染症、悪性腫瘍など、病理学総論で扱われている全ての範疇に属する疾患を含んでいる。例えば、筋ジストロフィー症におけるカルパイン、自己免疫疾患や神経疾患におけるユビキチン・プロテアソームシステムの破錠、アルツハイマー病のネプリライシンの発現低下、癌の浸潤・転移におけるMMPの発現亢進、病原微生物による病原体由来プロテアーゼ、止血機構におけるセリンプロテアーゼ、胎盤におけるアミノペプチターゼなどがあげられる。

カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインは筋ジストロフィ 症の筋蛋白質分解に関わる酵素として研究されてきた。カルパインはカルシウム との結合によって活性化される特異的な活性化機構を有し、骨格筋の構造維持に 重要なα-アクチニン、トロポニン、コネクチンなどの蛋白質を細胞内で限定分解 し、筋蛋白質分解の引き金を引くと考えられている。カルパインの切断配列(Kar 1sson, J. O. et al. (2000) Cell Biol. Int. 24, 235-243)としては、例えば Leu-Leu-Val-Tyr が分解基質として用いられている。

ユビキチン・プロテアソームシステムは、細胞内における選択的かつ能動的な蛋白質分解機構であり、シグナル伝達や細胞周期などの重要な細胞機能制御システムである。76個のアミノ酸からなるユビキチンは、ユビキチン活性化酵素(E1), ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)による連続的な触媒作用で蛋白質と共有結合し、ユビキチン化蛋白質は265プロテアソームにより分解される。数百種類存在するE3酵素はHECT型とRING フィンガー型に大別され、これらの酵素活性の異常はきわめて多くの疾患に関与する。265 プロテアソームに対する分解基質としては例えばLeu-Leu-Val-Tyrが用いられている(Reinheckel, T. et al. (2000) Arch. Biochem. Biophys. 377, 65-68)。

慢性関節リュウマチをはじめとする関節疾患は、関節軟骨の組織破壊により運動障害をきたす疾患である。関節軟骨の再生能はきわめて弱く、細胞外マトリックス分解による軟骨高次構造の崩壊は進行性の関節破壊へと導く。このような軟骨細胞外マトリックス分解には、MMPとその近縁遺伝子ファミリーのADAM(a disintegrin and metalloproteinase)分子の関わりが最近注目されている。特にADAM TS (ADAM with thrombospondin motif) 分子は軟骨プロテオグリカン (アグリカン) の分解に必須の酵素と考えられている (Tortorella, M.D. et al. (1999) Science 284, 1664–1666)。ADAMTSによってagricanが分解された配列が特定されている (Tortorella, M.D. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 18566–18573)。

これらのプロテアーゼの認識配列を用いることにより、該プロテアーゼが発現 する組織に特異的なベクターを調製することができる。

本発明において特に好ましいプロテアーゼ開裂配列は、癌で活性が亢進するプロテアーゼの切断配列である。このような配列を利用してベクターを構築することにより、癌特異的に感染を広げるベクターを構築することが可能となり、癌治療用の遺伝子送達ベクターとして極めて有用となる。癌で活性が亢進するプロテアーゼとは、ある癌組織または癌細胞において、その癌に対応する正常組織または正常細胞と比べ活性が亢進しているプロテアーゼを言う。ここで活性の亢進は、プロテアーゼの発現レベルの亢進および/または活性自体の亢進であってよい。プロテアーゼの発現レベルは、該プロテアーゼの遺伝子断片をプローブにしたノーザンハイブリダイゼーション、該プロテアーゼの遺伝子断片をプローブにしたノーザンハイブリダイゼーション、該プロテアーゼに対する抗体を用いたウェスタンブロット、ELISA、免疫沈降などにより測定することができる。またプロテアーゼの活性は、該プロテアーゼの基質を用いた分解アッセイにより知ることができる。生体内プロテアーゼは、種々の阻害因子により活性が調節されているものが数多く知られている。プロテアーゼの活性レベルは、これらの阻害因子の発現レベルを測定することによっても測定することができる。

例えば細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) 分解酵素の活性は、特に転移性の癌において活性が亢進している (Nakajima, M. and Chop, A.M., Se min. Cancer Biol. 2:115-127, 1991; Duffy, M.J., Clin. Exp. Metastasis 10: 145-155, 1992; 中島元夫「細胞外マトリクス分解酵素」, 清木元治 編集「癌の悪性化と転移」, 中外医学社, pp. 124-136, 1993年)。動物においては、細胞間の隙間に、コラーゲンやプロテオグリカンなどの蛋白からなるマトリックスが形成されている。細胞外マトリックスの成分としては、具体的には、コラーゲン・フィブロネクチン・ラミニン・テネイシン・エラスチン・プロテオグリカンなどが知られている。これらのECMは、細胞の接着、進展、または移動等の機能を調節したり、可溶性因子を結合してその分布や活性を調節する機能等を有している。癌転移にはECM分解酵素によるECMの浸潤が深く関わっており、実際ECM分解酵素の阻害剤による転移または基底膜浸潤の阻害が多数報告されている。ECM分解酵素による切断の認識配列を開裂部位に持つ改変F蛋白質をコードするベクターを設計することにより、癌特異的に感染および浸潤するベクターを構築することができる

ECM分解酵素は、活性中心にある触媒残基の種類によってアスパラギン酸プロテアーゼ、システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼおよびメタロプロテアーゼに分類される。中でも生体内でのECM分解には中性プロテアーゼのセリンプロテアーゼとメタロプロテアーゼが中心的な役割を果たしている。セリンプロテアーゼは、微生物、動物、植物等に広く分布し、高等動物においては、食物の消化、血液の凝固、線溶、免疫補体反応、細胞増殖、発生、分化、老化、癌転移などきわめて多くの生体反応に関与している。また、セリンプロテアーゼの活性は、一般に血漿や組織内に存在するセリンプロテアーゼインヒビター(serpin)によって調節されており、この量的あるいは質的異常は炎症などの原因となる。

ECM分解性セリンプロテアーゼとしては、カテプシンG、エラスターゼ、プラスミン、プラスミノーゲンアクチベーター、腫瘍トリプシン、キモトリプシン様中

性プロテイナーゼ、トロンビンなどが挙げられる。プラスミンは、生体内で不活 性な状態で存在するプラスミノーゲンが限定分解されて生じる。この限定分解を プラスミノーゲンアクチベーター (plasminogen activator; PA) とそのインヒビ ターであるプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (plasminogen activat or inhibitor; PAI) が制御している。PAには、血液凝固に関係する組織型PA(tP A) と、ECM分解に関係するウロキナーゼ型PA (uPA) とがある (Blasi, F. and Ve rde, P. Semin. Cancer Bio. 1:117-126, 1990)。これらの2つのPAは、PAIと結 合するとその作用が阻害される (Cajot, J.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6939-6943, 1990; Baker, M.S. et al., Cancer Res. 50:4676-4684, 199 0)。uPAは細胞表面のuPAレセプター(uPAR)と結合した状態で作用することがで きる。プラスミンはフィブロネクチン、テネイシン、ラミニンなどを分解するが 、コラーゲンは直接分解することができない。しかし、コラーゲン分解酵素の前 駆体の一部を切断して活性化することにより、間接的にコラーゲンを分解する。 これらが癌細胞においてしばしば活性が亢進しており、転移能ともよく相関して いる (Tanaka, N. et al., Int. J. Cancer 48:481-484, 1991; Boyd, D. et al. , Cancer Res. 48: 3112-3116, 1988; Hollas, W. et al., Cancer Res. 51: 369 0-3695, 1991; Correc, P. et al., Int. J. Cancer 50: 767-771, 1992; Ohkosh i, M. et al., J. Natl. Cancer Inst. 71: 1053-1057, 1983; Sakaki, Y. et al ., 現代医療 17: 1815-1821, 1985)。

uPA, tPAの切断配列についての研究も多くなされている(Rijken, D.C. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2920-2925; Wallen, P. et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta 719, 318-328; Tate, K.M. et al. (1987) Biochemistry 26, 33 8-343)。一般に用いられているsubstrate 配列はVGR (Dooijewaard, G., and KL UFT, C. (1983) Adv. Exp. Med. Biol. 156, 115-120) と、Substrate S-2288 (I le-Pro-Arg) (Matsuo, O. et al. (1983) Jpn. J. Physiol. 33, 1031-1037) である。Butenasは54種類の蛍光基質を用いて、tPAに対する特異性の高い配列を提

示し (Butenas, S, et al. (1997) Biochemistry 36, 2123-2131)、FPR, VPRが高いtPAに対する分解活性を示した。従って、これらの配列は特に好適に用いられる。

また、システインプロテアーゼまたはアスパルティックプロテアーゼに分類さ れるECM分解酵素も知られており、これらも癌の転移およに浸潤に関与している。 具体的には、ラミニン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、コラーゲン、プ ロコラゲナーゼ (分解により活性化する) 等を基質とするカテプシンB (Sloane, B.F., Semin. Cancer Biol. 1:137-152, 1990) 、エラスチン、プロテオグリカン 、フィブロネクチン、ラミニン、エラスターゼ(活性化)等を基質とするカテプ >>L (Kane, S.E. and Gottesman, M.M., Semin. Cancer Biol. 1:127-136, 199 0)、並びに、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、カテプシンBお よびL (活性化) を基質とするカテプシンD (Rochefort, H., Semin. Cancer Biol . 1:153-160, 1990) などが挙げられる。カテプシンBおよびLは特に乳癌組織 (Sp yratos, F. et al., Lancet ii: 1115-1118, 1989; Lah, T.T. et al., Int. J. Cancer 50: 36-44, 1992) 、大腸癌カルシノーマ (Shuja, S. et al., Int. J. C ancer 49: 341-346, 1991) に強く発現しており、阻害因子との均衡の破綻と癌の 悪性化との関与も示唆されている (Sloane, B.F., Semin. Cancer Biol. 1:137-1 52. 1990; Kane, S.E. and Gottesman, M.M., Semin. Cancer Biol. 1:127-136, 1990)。

メタロプロテアーゼ (metalloproteinase) はZnなどの金属元素を含む金属酵素であり、カスパーゼ、アミノペプチダーゼ、アンギオテンシンI変換酵素、コラゲナーゼなどが報告されている。ECMを分解するメタロプロテアーゼとしては、16種類以上のマトリックスメタロプロテアーゼ (matrtix metalloproteinase; MMP)が報告されている。代表的なMMPとしては、コラゲナーゼ-1、2、3 (MMP-1、8、13)、ゼラチナーゼA、B (MMP-2、9)、ストロメライシン1、2、3 (MMP-3、10、11)、マトリライシン (MMP-7)、膜型メタロプロテアーゼ (MT1-MMP、MT2-MMP)な

どが挙げられる。一般にMMPは、活性中心にZn²⁺を有し、酵素活性にCa²⁺を必要とする。また潜在型酵素(latent MMPまたはProMMPという)として分泌され、細胞外で活性化を受け生体内に存在する種々のECMを分解する。またMMPは、共通のインヒビターであるtissue inhibitor of mettaloproteinases(TIMP)によって活性が阻害される。他に、ECM分解性のメタロプロテアーゼとしては、アミノペプチダーゼが挙げられ、例えばECM構成蛋白質などを分解するアミノペプチダーゼN/CD13およびアミノペプチダーゼBなどが含まれる。阻害剤を用いた実験から、これらのプロテアーゼはいずれも癌と深く関与していることが報告されている。

その中でコラゲナーゼ (collagenase) (MMP-1, 8, 13) は、線維性コラーゲン であるI, II, III型コラーゲン分子を特異的部位で切断する。ゼラチナーゼ(gel atinase) は、ゼラチナーゼA (MMP-2) およびゼラチナーゼB (MMP-9) の2つのタ イプが知られている。ゼラチナーゼはIV型コラゲナーゼともよばれ、基底膜の主 成分であるIV型コラーゲンを分解するが、V型コラーゲンおよびエラスチンも分解 する。また、MMP-2はI型コラーゲンをMMP-1と同じ部位で切断することが知られて いる。MMP-9はラミニンおよびフィブロネクチンを分解しないが、MMP-2はこれら を分解する。ストロメライシン (stromelysin) (MMP-3, 10) は広い基質性を有 し、プロテオグリカン、III、IV、IX型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン などを分解する。マトリライシン (matrilysin) (MMP-7) は、ヘモペキシンドメ インをもたない分子であり、基質特異性はMMP-3と共通し、特にプロテオグリカン およびエラスチンに対する分解活性が高い。膜型メタロプロテアーゼ (membranetype MMP; MT-MMP) (MT1, 2, 3, 4, 5, 6-MMP) は膜貫通構造をもつMMPである。 MT-MMPは、プロペプチドドメインと活性部位の間に挿入配列(約10アミノ酸)を 有する。この挿入配列は Arg-Xaa-Lys-Arg (Xaaは任意のアミノ酸) を含み、細胞 膜上に輸送される過程で、細胞内プロセシング酵素であるfurinにより開裂され活 性化される。MT-MMPとしては、MT1-MMP(MMP-14)、MT2-MMP(MMP-15)、MT3-MMP (MMP-16) 、MT4-MMP (MMP-17) 、MT5-MMP (MMP-23) 、および MT-6-MMP (MMP-25) などが知られ、例えばMT1-MMPはI, II, III型コラーゲンを、MT3-MMPはIII型コラーゲンを分解する。

MMPの過剰発現は癌細胞で広範囲に起こっていることがわかっている。それらは癌自身と癌間質細胞による発現に分けられる。例えば間質コラーゲンを分解するコラゲナーゼ (MMP-1) は癌細胞の浸潤に関与しており、大腸癌等でもその活性レベルは転移性と相関している (Wooley, D.E., Cancer Metastasis, Rev. 3: 361-3, 72, 1984; Tarin, D. et al., Br. J. Cancer 46: 266-278, 1982)。また、タイプIVコラゲナーゼ (MMP-2、MMP-9) は様々な上皮性癌において活性と転移能との間に高い相関関係がある (Liotta, L.A., and Stetler-Stevenson, W.G., Semin. Cancer Biol. 1:99-106, 1990; Nakajima, M. 実験医学 10: 246-255, 1992)。また、ストロメライシン (MMP-3) も皮膚の上皮性腫瘍の悪性化に相関していることが知られている (Matrisian, L.M. and Bowden, G.T., Semi. Cancer Biol. 1: 107-115, 1990)。ストロメライシン-3 (MMP-11) は乳癌および大腸癌などにおいて高発現が観察されている (Basset, T. et al., Nature 348: 699-704, 1990; Porte, H. et al., Clin. Exp. Metastasis 10 (Suppl. 1): 114, 1992)。

MMPの切断基質は、多数知られている。MMP全般を分解する基質配列としてPLGLW AR (Bickett, D. M. et al. (1993) Anal. Biochem. 212, 58-64)、GPLGMRGL (De ng, S. J. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 31422-31427)、PQGLEAK (Beekma n, B. et al. (1996) FEBS Lett. 390, 221-225)、RPKPVEWREAK (Beekman, B. e t al. (1997) FEBS Lett. 418, 305-309)、PLALWAR (Jacobsen, E. J. et al. (1999) J. Med. Chem. 42, 1525-1536) がある。MMP-2, 9の分解基質としてPLGMWS (Netzel-Arnett, S. et al. (1991) Anal. Biochem. 195, 86-92) とPLGLG (Weingarten, H. et al. (1985) Biochemistry 24, 6730-6734) がある。

最近、phage-displayed peptide library screening によって、MMP9 (Kridel, S.J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 20572-20578), MMP2 (Chen, E.I. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 4485-4491), MT1-MMP (Kridel, S.J. et al

. (2002) J. Biol. Chem. In JBC Papers in Press, April 16, 2002, Manuscrip t M111574200) に対する分解基質配列が明らかにされている。これらの論文で、特定されたアミノ酸配列を3つのMMP に対する分解能の有無によって4つのグループに分類されている。Group IVがMT1-MMPに特異的に分解される配列で、Argのない配列としてVFSIPL, IKYHSの配列がMMP9, MMP2で分解できずMT-MMPでのみ分解できる基質としてしめされている。

例えば、MMP9の切断配列としては、Pro-X-X-Hy (Xは任意の残基, Hyは疎水性残 基を表す) が挙げられ、特にPro-X-X-Hy-(Ser/Thr) が好ましい。より具体的には 、Pro-Arg-(Ser/Thr)-Hy-(Ser/Thr)が例示できる(X-Hy間で切断が起きる)。Hy (疎水性残基) としては、これらに限定されないが、例えばLeu、Val、Tyr、Ile Phe、Trp、Metが挙げられる。あるいは、これ以外の切断配列も同定されており (例えば以下の文献のGroup I, II, IIIA, IIIB を参照; Kridel, S.J. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 20572-20578) 、これらの所望の配列を用いることが できる。またMMP2に関しても上記のPro-X-X-Hyであってよく、他にも、(Ile/Leu)-X-X-Hy、Hy-Ser-X-Leu、His-X-X-Hyなどが例示できる(例えば以下の文献のGro up I, II, III, IV を参照; Chen, E.I. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 44 85-4491)。MMP-7、MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-3、MT1-MMP(MMP-14)を含むMMP ファミリーの切断配列は、例えば天然の基質蛋白質の配列を参考にしたり、ある いはペプチドライブラリーのスクリーニング等によって適宜選択することができ る (Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19, 661-667 (2001); Woessner, J.F. and Nagase, H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. (Oxford Iniversity P ress, Oxford, UK, 2000); Fernandez-Patron, C. et al., Circ. Res. 85: 906-911, 1999; Nakamura, H. et al., J. Biol. Chem. 275: 38885-38890, 2000; Mc Quibban, G.A. et al., Science 289: 1202-1206, 2000; Sasaki, T. et al., J. Biol. Chem. 272: 9237-9243, 1997)。例えば切断部位の8アミノ酸 P4-P3-P2-P 1-P1'-P2'-P3'-P4' (P1-P1'間で切断される) を例示すれば、MMP-1は VPMS-MRGG

、MMP-3は RPFS-MIMG、MMP-7はVPLS-LTMG、MT1-MMPはIPES-LRAG などが挙げられるがこれらに制限されない。MMP-8には例えばPLAYWAR (Nezel-Amett, S. et al., Anal. Biochem. 195: 86, 1991) が挙げられる。MMPの合成基質は様々なものが入手可能であり、これらの配列を比較することもできる(例えば Calbiochem 登録商標 カタログ、Merk、の各 MMP Substrate 参照)。

通常、組織内のMMP活性は、潜在型酵素の産生、その潜在型酵素の活性化、および活性型酵素のインヒビターによる阻害の過程で調節されており、発生排卵、受精、子宮内膜への着床、および創傷治癒などの様々な生理現象に関与している。MMP活性の調節の障害は、癌細胞の浸潤・転移、関節炎、歯肉炎、動脈硬化、腫瘍、線維症などの様々な病態に寄与する。例えば、癌の転移には基底膜成分を分解するゼラチナーゼ(MMP-2、-9)が重要であることが知られている。MMP-2は、MT1-MMPによるpro-MMP-2の切断により活性化される。またMMP-9の活性化には、uPAによりまずプラスミノーゲンからプラスミンがつくられ、proMMP-3を活性化し、active MMP-3がproMMP-9を活性化する経路が存在し、この経路は癌の転移に関与している。本発明のベクターを癌標的ベクターとして開発するためには、F蛋白質の開裂部位にこれらの癌転移に関与するプロテアーゼで切断される配列を導入することが特に有用である。このようなプロテアーゼとしては、例えば MMP-2、MMP-9、uPA、MMP-3、および MT1-MMP が挙げられ、特にMMP-2、MMP-9、および uPAが挙げられる。

プロテアーゼ切断配列をF蛋白質に組み込む場合は、F蛋白質の開裂部位に目的のプロテアーゼ切断配列を挿入し、もともとあるTrypsin様プロテアーゼによる切断部位をデジェネレートさせることが好ましい。このためにはもともとのTrypsin様プロテアーゼによる切断部位周辺のアミノ酸配列を、目的のプロテアーゼ切断配列 (認識配列) に置換すればよい。改変F蛋白質は、細胞で発現したときに目的のプロテアーゼで切断され、かつF蛋白質の細胞膜融合作用を維持されている蛋白質である。F蛋白質が開裂して生じるF1断片のN末端付近のアミノ酸は、細胞膜融

合に重要な機能を有していると考えられる。従って、切断が阻害されない限り、 切断後のF1断片のN末端が、野生型F蛋白質のF1断片のN末端と同一となるように切り 断配列を設計することが好ましい。また効率的な切断反応を起こすために切断部 位にリンカーを挿入する場合には、切断後のF1断片のN末端に、野生型F1と比べ最 小限のアミノ酸が付加されるように設計することが望ましい。例えば、切断後のN 末端には、野生型F1に比べ5アミノ酸以内、好ましくは4アミノ酸以内、より好ま しくは3アミノ酸以内(例えば1、2、または3アミノ酸)が付加されるようにする 。例えば本発明において、改変F蛋白質のF1断片のN末端に Met-Thr-Ser(配列番 号:1)を付加しても、MMPによる切断反応および切断後の細胞膜融合反応が障害 されないことが判明した。従って、切断後のF1のN末端に Met-Thr-Ser またはそ の保存的置換配列、あるいはそれらの部分配列からなるアミノ酸が付加されるよ うに開裂配列を設計することは好ましい。保存的置換とは、アミノ酸の側鎖の化 学的性質が類似したアミノ酸間での置換を言う。具体的には、Metに関してはIle またはValへの置換、Thrに関してはSerまたはAlaへの置換、Serに関してはAla、A sn、またはThrへの置換が挙げられる。各位置のアミノ酸の置換は独立に行ってよ

具体的には、好ましい切断配列として、例えばMMP-2および-9の切断配列としてはPro-Leu/Gln-Gly(配列番号:2)を含む配列を挙げることができる。この配列は、基質として利用されている合成基質(Netzel-Arnett, S. et al., Anal. Bio chem. 195,86-92(1991))に共通の配列であり、この配列が、改変したF蛋白質を切断後のF2断片のC末端に来るようにF蛋白質を設計する。このためには、野生型F蛋白質の切断後のF2断片のC末端のアミノ酸を含む配列を、Pro-Leu/Gln-Glyを含む配列に置換すればよい。もともとのF蛋白質のF2断片のC末端の1または数アミノ酸に相当する配列を適宜欠失させ、Pro-Leu/Gln-Glyを挿入する(すなわち置換する)。欠失させるアミノ酸は、例えば挿入するアミノ酸数を同じ(例えば3アミノ酸)とするか、0~10アミノ酸程度の範囲で選択することができる。プロテア

ーゼによる開裂および膜融合の過程が障害されない限り、Pro-Leu/Gln-Glyの下流にF1のN末端が直接連結するようにF蛋白質を調製することができるが、センダイウイルスのF蛋白質などにおいては、開裂配列とF1断片は適当なスペーサーを介して連結されることが好ましい。このようなスペーサーを含む開裂配列としては、特に好ましくは、Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser(配列番号: 3)、または Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr (配列番号: 4)を含む配列が挙げられる。Met、Thr、およびSerは、他のアミノ酸に保存的置換してもよい。より好ましくは、開裂後のF2においてC末端となるアミノ酸からN末方向に連続する 1~10残基、例えば 1、2、3、4、5、または6残基が、Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Ser、または Pro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr からなる配列に置換された改変F蛋白質を好ましい蛋白質として挙げることができる。例えば、センダイウイルスF蛋白質を例に挙げれば、野生型F蛋白質においてF2断片のC末4アミノ酸に相当する配列(株によるが典型的には 113Pr o-Gln-Ser-Arg¹¹⁶↓)(配列番号: 5)をPro-Leu/Gln-Gly-Met-Thr-Serなどに置換したF蛋白質を例示することができる。

また、MMPの切断配列としては他にも、例えば本明細書に記載した所望の配列を用いることができる。各種MMPの基質特異性に関してはペプチドライブラリーを利用して解析が行われている(Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19, 661-667 (2001))。また、着目しているMMP-2 (Chen, E.I. et al., J. Biol. Chem. 277(6) 4485-4491 (2002))及びMMP-9 (Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. 276(8) 20572-20578 (2001))についても詳細な解析が行われ、特にMMP-9について、Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr)のP3からP2'(P3-P2-P1-P1'-P2';切断はP1-P1'間で起こる)までのコンセンサス配列(X=全ての残基、Hy=疎水性残基)が提唱されている。このコンセンサス配列は、MMP-2について提唱されているものの一つ(Pro-X-X-Hy)にも合致するので、MMP-2及びMMP-9について特異性を出すためには良いデザインの一つであると考えられる。この点からも、上記例示した配列(Pro-Leu/G1n-G1y-Met-Thr)は好ましい例として支持される

。すなわち、F蛋白質開裂部位はPro-X-X-Hy-Thr/Ser、さらに好ましくはPro-X-X-Hy-Thr/Ser-Thr/Serを含む配列が好ましい("Thr/Ser"はThrまたはSerのどちらかを表す)。例えば、Pro-X-X-Hy-Thr/Serに当てはまらないPro-Leu-Gly-Leu-Trp-Alaは好ましくない(図44)。Pro-X-X-Hy-Thr/Ser配列に合致するペプチドをF蛋白質開裂部位に組み込めば、MMP存在下で高い浸潤力を示すベクターを製造することができる。

また、好ましい切断配列としては他に、プラスミノーゲンアクチベーターにより切断される配列が挙げられる。具体的には、uPAおよびtPAの切断配列として Va 1-Gly-Arg を含む配列が挙げられる。この配列が、改変したF蛋白質を切断後のF2 断片のC末端に来るようにF蛋白質を設計する。このためには、野生型F蛋白質の切断後のF2断片のC末端のアミノ酸を含む配列を、Val-Gly-Arg(配列番号:6)を含む配列に置換すればよい。より好ましくは、開裂後のF2のC末端となるアミノ酸からN末方向に連続する 1~10残基、例えば 1、2、3、4、5、または6残基を Val-Gly-Arg またはこれを含む配列に置換された改変F蛋白質を好ましい蛋白質として挙げることができる。例えば、センダイウイルスF蛋白質を例に挙げれば、野生型F蛋白質においてF2断片のC末3アミノ酸に相当する配列(株によるが典型的には 11 切りについてF2断片のC末3アミノ酸に相当する配列(株によるが典型的には 11 切りについてF2断片のC末3アミノ酸に相当する配列(株によるが典型的には 11 切りについてF2断片のC末3アミノ酸に相当する配列(株によるが典型的には 11 切りについてF2断片のC末3アミノ酸に相当する配列(株によるが典型的には 11 切りについてF2断片のC末3アミノ酸に相当する配列(株によるが真型的には 11 切りについて 11 切りにして
特定のプロテアーゼ存在下で融合能を発揮する改変F蛋白質を効率良く同定するために、プラスミドベクターを用いたアッセイ系を利用することができる(実施例31)。すなわち、改変F蛋白質を発現するプラスミドベクターを細胞のトランスフェクションし、プロテアーゼ存在下で培養してシンシチウム形成を検出する。シンシチウムを形成させるプラスミドにコードされる改変F蛋白質は、プロテアーゼにより開裂し融合能を示すを判断される。例えばMMPにより開裂するF蛋白質をアッセイするには、MMPを発現するHT1080細胞を用いることができる。あるいは、培養系にMMPを添加してもよい。本発明において開発されたこのアッセイ系を用

いれば、融合能を持った改変F蛋白質を容易に取得することが可能である。

改変F蛋白質をコードするベクターは、該改変F蛋白質を開裂するプロテアーゼの存在に依存して、該ベクターが導入された細胞と接触する細胞に、ベクターに含まれるゲノムRNAを導入することができる。開裂したF蛋白質の働きにより、接触する細胞同士が細胞融合を起こし、融合した細胞にRNPが拡散する。すなわち、本発明のベクターは、ウイルス粒子は形成しないが、このように接触する細胞にベクターが浸潤するために、限局した領域にベクターを伝達することができる。プロテアーゼは、細胞内または細胞外に発現するものであってもよく、あるいは外来的に添加されたものであってもよい。

本発明により提供される改変F蛋白質は、特定のプロテアーゼに依存的に細胞融合能を示す能力を有する。この蛋白質を利用して、そのプロテアーゼ存在下でのみ細胞融合を生じさせる或いは特異的に感染するウィルスベクター、あるいはリポソームなどの薬剤・遺伝子送達ベクターを作り出すことができる。例えば、F、HN遺伝子を搭載したadenovirus vector (Galanis, E. et al., Hum. Gene Ther. 12, 811-821 (2001)) のF遺伝子に癌で発現するプロテアーゼで開裂する改変F蛋白質の遺伝子を搭載することにより、特定のプロテアーゼ存在下で細胞融合を生じさせるベクターを開発することが可能である。更には、例えばレトロウィルスをF、HN蛋白でシュードタイプ化する場合に(Spiegel、M. et al., J Virol. 72(6) 5296-5302 (1998)) 、その製造過程において、癌で発現するプロテアーゼで開裂する改変F蛋白質を利用すれば、癌で特異的に感染する癌細胞標的化ベクターを開発することが可能かも知れない。このように、本発明により提供される改変F蛋白質およびこれをコードする核酸は、本発明のベクター以外にも、プロテアーゼに依存する種々のベクターの開発に利用することができる。

また本発明は、細胞質ドメインの欠失により細胞融合能が高められた改変F蛋白質を含むパラミクソウイルスベクターを提供する。この改変F蛋白質は、細胞質ドメインに0個~28個、より好ましくは1~27個、より好ましくは4~27個のアミノ酸

を有するように、細胞質ドメインの一部のアミノ酸を欠失させたF蛋白質である。 細胞質ドメインとは、膜蛋白質の細胞質側のドメインであり、F蛋白質においては 膜貫通(TM)領域のC末側領域である(図42参照)。例えば、細胞質ドメインとし て6~20個、より好ましくは10~16個、より好ましくは13~15個のアミノ酸を有す るF蛋白質は、野生型F蛋白質に比べ有意に高い細胞融合能を示す。従って、約14 アミノ酸の細胞質ドメインを有するように改変されたF蛋白質を含むパラミクソウ イルスベクターを調製すれば、野生型F蛋白質を用いるよりも高い細胞融合能を持 つベクターを得ることができる。好ましくは、この欠失F蛋白質は、野生型F蛋白 質のC末端の10アミノ酸またはそれ以上、より好ましくは15アミノ酸またはそれ以 上、より好ましくは20アミノ酸またはそれ以上、より好ましくは25アミノ酸また はそれ以上、より好ましくは28アミノ酸またはそれ以上を欠失している。最も好 ましい態様では、細胞質ドメイン欠失型のF蛋白質は野生型F蛋白質のC末端の約28 アミノ酸を欠失している。これらの細胞質ドメイン欠失型のF蛋白質をコードする 遺伝子をゲノムに含むパラミクソウイルスベクターは、通常のベクターに比べ細 胞融合能が高いことから、周囲の細胞へより強く浸潤することができる。このF蛋 白質の開裂部位を本明細書に記載したように改変すれば、特定のプロテアーゼの 存在下でのみ、高い浸潤力を発揮するベクターを得ることができる。

さらに本発明は、パラミクソウイルスが持つ2種のスパイク蛋白質の融合蛋白質に関する。パラミクソウイルスには細胞融合を機能すると考えられる蛋白質(これをF蛋白質と呼ばれる)と、細胞への接着に機能すると考えられる蛋白質(HNまたは Hなどと呼ばれる)を有している。本明細書において、前者をF蛋白質、後者をHN蛋白質を総称する。この2つの蛋白質を融合蛋白質として発現させると、別々に発現させる場合に比べ非常に強い融合能を発揮することができる。この融合蛋白質は、互いの細胞質ドメインの部分で両者の蛋白質が結合されている。具体的には、融合蛋白質のN末端側にF蛋白質を、C末端側にHN(またはH)蛋白質を含んでいる。両者の蛋白質を融合させる場合、全長蛋白質同士を融合させても

よいが、F蛋白質の細胞質ドメインの一部または全部を欠失させた蛋白質をHN(またはH)蛋白質に融合させてもよい。この場合、F蛋白質のTM領域の下流からHN(またはH)蛋白質までの長さを5残基以上、より好ましくは10残基以上、より好ましくは10残基以上、より好ましくは14残基以上、より好ましくは20残基以上とする。例えば、F蛋白質の細胞質ドメインを欠失させた蛋白質をHN(またはH)蛋白質に融合させる場合、F蛋白質部分のC末に適当な長さのリンカーペプチドを付加して長さを調節することは好ましい。具体的には、14残基のF蛋白質の細胞質ドメインを持つ細胞質ドメイン欠失型のF蛋白質に、任意のリンカーペプチドを介してHNまたはH)蛋白質に融合させた蛋白質を好適に用いることができる。リンカーペプチドの長さは、例えば約50残基とすることができる。リンカーペプチドのアミノ酸配列に特に制限はないが、有意な生理活性を持たないポリペプチドが好ましく、例えば図43(配列番号:80)に例示したようなポリペプチドを用いることができる。

また本発明は、これらの融合蛋白質をコードする核酸、および該核酸を搭載する発現ベクターに関する。この発現ベクターを導入した細胞は、強い融合能を示し周囲の細胞と融合してシンシチウムを形成する。発現ベクターとしては特に制限はなく、プラスミドベクターおよびウイルスベクターなどが例示できる。DNAベクターの場合は、例えばCAGプロモーター(ニワトリβアクチンプロモーターとCM Vエンハンサーとのキメラプロモーター)(Niwa, H. et al. (1991) Gene. 108: 193-199)などの強力なプロモーターを組み合わせることが好ましい。また、この蛋白質を発現するウイルスベクターは、導入細胞で強い融合を引き起こす。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アナウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ルンチウイルスベクター、レンチウイルスベクター、セムリキ森林ウイルスベクター、シンドビスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、フォウルポックスウイルスベクター、その他の所望のウイルスベクターが例示できる。特にこの蛋白質を発現するパラミクソウイル

スベクターは、様々な組織に対して高い浸潤力を発揮することができる。特に、本明細書に記載したF開裂部位を改変した融合蛋白質をコードする、M遺伝子欠失型のパラミクソウイルスベクターを用いれば、特定の組織で強い細胞融合を引き起こすベクターを製造することが可能である。

これらの組み換えウイルスベクターは当業者に周知の方法に従って調製するこ とができる。例えば、遺伝子治療などに最も普通に利用されるアデノウイルスベ クターの作製は、斎藤らの方法および他(Miyakeら、1996、Proc. Natl. Acad. S ci. USA、93巻、1320-24頁;Kanegaeら、1996、Acta Paediatr.Jpn、38巻、182-1 88頁;鐘ヶ江ら、バイオマニュアルシリーズ4-遺伝子導入と発現・解析法、1994 - 43-58頁、羊土社;鐘ヶ江ら、1994、細胞工学、13巻、8号、757-763頁)に従っ て製造することができる。また、例えばレトロウイルスベクター(脇本ら、1995 、蛋白質核酸酵素、40巻、2508-2513頁)、およびアデノ随伴ウイルスベクター(玉寄ら、1995、蛋白質核酸酵素、40巻、2532-2538頁)なども、公知の方法により 調製することができる。哺乳動物に遺伝子導入可能なその他のウイルスベクター を製造するための詳細は、組換えワクシニアウイルスを製造する方法としては、 特表平6-502069、特公平6-95937、特公平6-71429が知られている。組換えパピロ ーマウイルスを製造する方法としては特公平6-34727、特表平6-505626が知られて いる。組換えアデノ随伴ウイルスを製造する方法としては、特開平5-308975が知 られている。組換えアデノウイルスを製造する方法としては、特表平6-508039が 知られている。

本発明の一態様において提供されるベクターに含まれるRNAゲノムにおいては、M (マトリックス) 蛋白質をコードする遺伝子 (M遺伝子) が変異または欠損している。本発明において、F蛋白質の開裂部位を他のプロテアーゼで切断される配列に改変し、さらにM遺伝子を変異または欠失させて粒子形成能を抑制することによって、ウイルス粒子を放出せず、特定のプロテアーゼを発現する細胞集団内でのみベクターを浸潤させる全く新しい性質を持ったベクターが開発された。M遺伝子

の変異は、宿主内環境における粒子形成活性を消失または有意に低下させる変異である。このような変異は、このM蛋白質を発現する細胞において、該蛋白質の細胞表面の凝集が低下することにより同定することができる(実施例参照)。

本発明により、2次放出粒子、即ちVLP放出の抑制を目的とした改変を行う場合、M蛋白を欠失させることが最も効果的であることが実証された。このことは、ビリオン形成におけるM蛋白の役割に関するセンダイウィルス (SeV) や他のマイナス鎖RNAウィルスにおける報告によっても支持される。例えば、vesicular stomatitis virus (VSV) ではM蛋白の強発現のみでウィルス様粒子 (VLP: virus like particle) の発芽が観察されており (Justice, P.A. et al., J. Virol. 69; 315 6-3160 (1995))、またParainfluenza virusの場合もM蛋白のみの強発現でVLPが生じることが報告されている (Coronel, E.C. et al., J. Virol. 73; 7035-7038 (1999))。このようなM蛋白単独でのVLP形成に関しては、全てのマイナス鎖RNAウィルスで観察されているわけではないが、M蛋白がビリオン形成のcoreになっていることは、マイナス鎖RNAウィルスで共通していると認識することができる(Garoff, H. et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62; 1171-1190 (1998))。

ビリオン形成に対するM蛋白の具体的な役割に関して主に以下のようにまとめることができる。ビリオン形成の場となるのは細胞膜上のリピッドラフト (Lipid rafts) と呼ばれている場 (Simons, K. and Ikonen, E. Nature 387; 569-572 (1997)) であり、元々はTriton X-100のような非イオン性界面活性剤に不溶性の脂質面分として同定された (Brown, D. A. and Rose, J. K. Cell 68; 533-544 (1992))。インフルエンザウィルス (Ali, A. et al., J. Virol. 74; 8709-8719 (2000))、麻疹ウィルス (Measles virus; MeV: Manie, S. N. et al., J. Virol. 74; 305-311 (2000)) 及びSeV (Ali, A. and Nayak, D. P. Virology 276; 289-303 (2000)) 等でリピッドラフト (Lipid rafts) でのビリオン形成が証明されており、そこでM蛋白はエンベロープ蛋白 (spike蛋白とも表記される) やribonucleoprote in (RNP) を濃縮しビリオン形成を促進する、即ちウィルスアセンブリと出芽 (bu

dding) の駆動力となっていると考えられる(Cathomen, T. et al., EMBO J. 17; 3899-3908 (1998), Mebatsion, T. et al., J. Virol. 73; 242-250 (1999))。 実際に、M蛋白はspike蛋白のcytoplasmic tailと結合することが、インフルエンザウィルス (Zhang, J. et al., J. Virol. 74; 4634-4644 (2000)) 及びSeV (Sanderson, C.M. et al., J. Virol. 67; 651-663 (1993)) 等で示されており、またRNPとの結合もインフルエンザウィルス (Ruigrok, R.W. et al., Virology 173; 311-316 (1989)) や、パラインフルエンザウィルス及びSeV (Coronel, E.C. et al., J. Virol. 75; 1117-1123 (2001)) 等で示されている。更に、M蛋白自身のオリゴマー形成への関与がSeV (Heggeness, M.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 79; 6232-6236 (1982)及び水疱性口内炎ウィルス (Vesicular Stomatitis Virus; VSV: Gaudin, Y. et al., Virology 206; 28-37 (1995), Gaudin, Y. et al., J. Mol. Biol. 274; 816-825 (1997)) 等で報告され、これら多くのウィルスコンポーネント及び脂質との結合能がウィルスアセンブリと出芽の駆動力としての役割を担わせていると考えることができる。

また、エンベロープ蛋白 (spike蛋白) に関しても改変によりVLP放出抑制に繋がる可能性も既に幾つか示唆されている。ビリオン形成が実際に減少した具体的な報告として以下の実験例がある。狂犬病ウィルス (Rabies virus; RV) の場合、G蛋白欠失型においてVLP形成が1/30に減少し (Mebatsion, T. et al., Cell 84; 941-951 (1996))、M蛋白欠失型においては1/500,000以下に減少したと報告されている (Mebatsion, T. et al., J. Virol. 73; 242-250 (1999))。また、麻疹ウィルス (MeV) の場合、M蛋白欠失型においてcell-to-cellの融合が亢進し (Cathomen, T. et al., EMBO J. 17; 3899-3908 (1998))、これはビリオン形成が抑制された為であると考えることができる (Li, Z. et al., J. Virol. 72(5), 3789-3795 (1998))。また、同様の融合亢進がF或いはH蛋白のcytoplasmic tail (細胞質側のテール)の変異によっても生じている (Cathomen, T. et al., J. Virol. 72; 1224-1234 (1998))。従って、Fおよび/またはHN蛋白のcytoplasmic tail

1のみを欠失させる変異を導入することにより、粒子形成を抑制することも考えら れる。但し、特にSeVにおいてはF欠失型 (W000/70070) 或いはHN欠失型 (Stricke r, R. and Roux, L., J. Gen. Virol. 72; 1703-1707 (1991)) において多くのVL Pが存在することが報告されており、これらのスパイク蛋白質の改変による効果は 限定されることが予想される。さらにSeVにおいては以下の点も明らかになってい る。SeVのF及びHNが分泌経路に載っている間(即ちゴルジ体等に存在している間)、それぞれ(F及びHN)のCytoplasmic tailがM蛋白と結合していることが示さ れている (Sanderson, C.M. et al., J. Virol. 67; 651-663 (1993), Sanderson , C.M. et al., J. Virol. 68; 69-76 (1994))。即ち、ビリオン形成の場である 細胞膜上のリピッドラフト (Lipid Rafts) 〜M蛋白が効率的に運搬されるために は、F及びHNのCytoplasmic tailとの結合が重要であり、M蛋白は細胞質に存在し ながらF及びHNと結合することで、F及びHNの分泌経路に乗った形で細胞膜へ運搬 されていると予想される。このように、M蛋白質はウイルス粒子の形成に本質的な 役割を果たしており、M蛋白質の細胞膜上の凝集を失わせるような変異M蛋白質遺 伝子を用いることにより、粒子形成能を持たないベクターを作り出すことが可能 となる。

細胞におけるM蛋白質の局在の検出は、細胞分画による方法、および免疫染色によりM蛋白質の局在を直接検出する方法などで実施することができる。免疫染色では、例えば蛍光標識された抗体を用いてM蛋白質を染色し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察することができる。また、細胞を溶解後、公知の細胞分画法により細胞画分を得て、M蛋白質に対する抗体を用いた免疫沈降またはウェスタンプロッティング等によりM蛋白質が含まれる画分を同定することにより局在を調べることができる。ビリオン形成の場となるのは細胞膜上のリピッドラフト(Lipid rafts)と呼ばれている場であり、Triton X-100のような非イオン性界面活性剤に不溶性の脂質画分である。M蛋白質はspike蛋白、RNP及びM蛋白自身更には脂質との結合能により、このリピッドラフトでウィルスコンポーネントを凝集すると考えられて

いることから、リピッドラフト分画後、電気泳動等で検出されるM蛋白は凝集した M蛋白質を反映していると捉えることができる。すなわち、検出されるM蛋白質量 が低下していれば、細胞表面のM蛋白質の凝集が低下していると判断される。一方 、本発明者らが利用した細胞免疫染色により細胞内局在を検出する方法では、細 胞膜上のM蛋白の凝集を直接観察することが可能である。この場合、細胞免疫染色 に利用可能な抗M抗体を利用する。この方法で検出した場合、M蛋白質が凝集して いれば、細胞膜近傍に強い濃縮像が観察され、M蛋白の凝集がなければ濃縮像はな く細胞膜の輪郭が明確でなくなり、細胞質全体が薄く染色される。このように濃 縮像が少ない或いは濃縮像がなく、細胞膜の輪郭がぼやけて観察され、細胞質全 体が薄く染色された場合に、細胞表面のM蛋白質の凝集が低下していると判断され る。

野生型M蛋白質に比べ、細胞表面における凝集が有意に低下する変異M蛋白質は、粒子形成能が有意に低下していると判断される。ウイルスの粒子形成能の低下は、例えば統計学的に有意(例えば有意水準5%またはそれ以下の%値)に低下している。統計学的な検定は、例えばスチューデントのt検定またはマンホイットニーU検定などにより行うことができる。変異M遺伝子を持つウイルスベクターは、宿主内環境における粒子形成能が好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下、より好ましくは1/30以下、より好ましくは1/50以下、より好ましくは1/100以下、より好ましくは1/300以下、より好ましくは1/500以下に低下している。本発明のベクターは、最も好ましくは宿主内環境におけるウイルス粒子の産生能が実質的に喪失している。実質的に喪失するとは、宿主内環境におけるウイルス粒子の産生が検出されないことを言う。このような場合、ウイルス粒子は10³/ml以下、好ましくは10²/ml以下、より好ましくは10¹/ml以下である。

ウイルス粒子の存在は、電子顕微鏡等で直接確認することができる。あるいは、ウイルスに含まれる核酸または蛋白質を指標に検出および定量することが可能である。例えば、ウイルス粒子中に含まれるゲノム核酸をPCR等の一般的な核酸検

出法で検出および定量してもよい。あるいは、外来遺伝子を持つウイルス粒子は、これを細胞に感染させ該遺伝子の発現を検出することにより定量することができる。感染性を持たないウイルス粒子は、トランスフェクション試薬と組み合わせて細胞に導入し、遺伝子発現を検出することにより定量することができる。本発明においてウイルス粒子は、感染能を持たない粒子も含まれ、例えばVLPを含む

また、ウイルスの力価は、例えばCIU (Cell-Infected Unit) 測定または赤血球 凝集活性(HA)の測定することにより決定することができる(W000/70070; Kato, A . et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Yonemitsu, Y. & Kaneda, Y., Hemag gulutinating virus of Japan-liposome-mediated gene delivery to vascular c ells. Ed. by Baker AH. Molecular Biology of Vascular Diseases. Method in Molecular Medicine: Humana Press: pp. 295-306, 1999)。また、実施例に記載 したように、GFPなどのマーカー遺伝子を搭載したベクターについては、マーカー の指標に直接的に感染細胞をカウントすることにより力価を定量することができ る (例えばGFP-CIUとして)。このようにして測定した力価は、CIUと同等に扱う ことができる (WO00/70070)。例えばウイルス粒子が含まれる可能性のある試料 を細胞にトランスフェクションしても検出可能な感染価を示さないことにより、 ウイルス粒子の生産能の喪失を確認することができる。感染能を持たないウイル ス粒子 (VLP等) の検出は、例えばリポフェクション試薬を用いたトランスフェク ションにより行うことができる。具体的には、例えばDOSPER Liposomal Transfec tion Reagent (Roche, Basel, Switzerland; Cat No. 1811169) を用いて行うこ とができる。ウイルス粒子を含むあるいは含まない溶液 $100\,\mu\,1$ にDOSPER $12.5\,\mu\,1$ を混合し、室温で10分放置後、6 wellプレートにコンフルエントに培養した細胞 に15分毎に振盪しながらトランスフェクションする。2日後に感染細胞の有無を検 出することでVLPの検出が可能である。

宿主内環境とは、対象とするベクターが由来するパラミクソウイルスの野生型

が自然界において通常増殖する宿主内の環境またはそれと同等のウイルス増殖をもたらす環境を言う。宿主内環境は例えば該ウイルスの至適増殖条件であってよい。哺乳動物を宿主とするパラミクソウイルスであれば、哺乳動物生体内あるいはそれと同等の環境を言う。その温度は、哺乳動物体内に相当する約37~38℃(例えば37℃)である。インビトロであれば、通常の細胞培養条件、具体的には血清含有または非含有培地中(pH $6.5\sim7.5$)、37℃、5%CO $_2$ 、湿環境下の培養環境が挙げられる。

環境条件による変異M蛋白質の活性の違いは、M蛋白質の温度感受性変異などの 条件的変異において意味を持っている。条件的変異とは、宿主内環境では機能欠 失型 (loss of function) の変異形質を示すが、ある環境において活性を示す変 異を言う。例えば37℃では機能がほとんどまたは全く失われるが、低温条件にお いては機能が回復する温度感受性変異M蛋白質をコードする遺伝子を好適に用いる ことができる。温度感受性変異とは、低温(例えば32℃)に比べ、髙温(例えば3 7℃)において有意に活性が低下する変異を言う。本発明者らは、M蛋白質の温度 感受性変異体を用いて、宿主内環境に相当する37℃において粒子形成能が劇的に 低下したウイルス粒子を製造することに成功した。この変異M蛋白質は、低温条件 下(例えば32℃)では細胞表面への凝集を示し、ウイルス粒子を形成させるが、 通常の宿主体内の温度(37℃)では凝集性が失われウイルス粒子を形成すること ができない。このような温度感受性変異M蛋白質をコードする核酸をゲノムに持つ ベクターは、本発明のベクターとして好適である。条件的変異M蛋白質をコードす るウイルスベクターは、M蛋白質が機能できる条件、すなわち許容条件でベクター を複製させることによりM蛋白質が機能してウイルス粒子が形成される。このよう にして製造したウイルス粒子は、通常環境下で感染させるとM蛋白質が機能できず に粒子を形成しない。

M遺伝子の温度感受性変異としては特に限定されるものではないが、例えばセンダイウィルスのM蛋白質のG69、T116、およびA183からなる群より選択される少な

くとも1つ、好ましくは任意に選択される2つ、さらに好ましくは3つすべてのアミノ酸部位、あるいは他の(-)鎖RNAウィルスM蛋白質のそれらと相同な部位に変異を含むものを好適に用いることができる。ここでG69とはM蛋白質の69番目のアミノ酸Gly、T116とはM蛋白質の116番目のアミノ酸Thr、A183とはM蛋白質の183番目のアミノ酸Alaを指す。

M蛋白質をコードする遺伝子 (M遺伝子) は、(-)鎖RNAウイルスで広く保存されており、ウイルスのヌクレオカプシッドとエンベロープの両者に相互作用する機能を有することが知られている (Garoff, H. et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:117-190 (1998))。また、SeV M蛋白質においてamphiphilic α-helixと予想されている104-119 (104-KACTDLRITVRRTVRA-119/配列番号: 45) は粒子形成に重要な領域として同定されている (Genevieve Mottet et al., J. Gen. Virol. 80:2977-2986 (1999))が、当該領域は(-)鎖RNAウイルス間で良く保存されている。M蛋白質のアミノ酸配列は(-)鎖RNAウイルスで類似しており、特にパラミクソウイルス亜科においては既知のM蛋白質は共通して全長約330~380アミノ酸からなる塩基性蛋白質であり、全領域にわたって類似性があるが、特にC端側半分での類似性が高い (Gould, A. R. Virus Res. 43:17-31 (1996)、Harcourt, B.H. et al., Virology 271:334-349 (2000))。従って、例えば SeV M蛋白質のG69、T116、及びA183と相同なアミノ酸は容易に同定することが可能である。

SeV M蛋白質のG69、T116、及びA183と対応する他の(一)鎖RNAウィルスM蛋白質の相同な部位のアミノ酸は、当業者であれば、例えばBLASTなどのアミノ酸配列のホモロジー検索プログラム (アライメント作成機能を持つもの) またはCLUSTAL Wなどのアライメント作成プログラムを用いてSeV M蛋白質のアミノ酸と整列化することにより同定することができる。例えばSeV M蛋白質のG69に相当する各M蛋白質の相同部位としては、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1) (括弧は略称)であればG69、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3) であればG73、phocine distemper virus (PDV)およびcanine distemper virus (CDV)であればG70、dolphin m

olbillivirus (DMV)であればG71、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、m easles virus (MV)、およびrinderpest virus (RPV)であればG70、Hendra virus (Hendra)およびNipah virus (Nipah)であればG81、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)であればG70、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)およびhuman p arainfluenza virus-4b (HPIV-4b)であればE47、mumps virus (Mumps)であればE7 2が挙げられる(文字と番号はアミノ酸とその位置を表す)。また、SeV M蛋白質 のT116に相当する各M蛋白質の相同部位としては、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)であればT116、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)でればT120、pho cine distemper virus (PDV)およびcanine distemper virus (CDV)であればT104 、dolphin molbillivirus (DMV)であればT105、peste-des-petits-ruminants vir us (PDPR)、measles virus (MV)およびrinderpest virus (RPV)であればT104、He ndra virus (Hendra)およびNipah virus (Nipah)であればT120、human parainflu enza virus-2 (HPIV-2)およびsimian parainfluenza virus 5 (SV5)であればT117 human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)およびhuman parainfluenza virus-4 b (HPIV-4b)であればT121、mumps virus (Mumps)であればT119、Newcastle disea se virus (NDV)であればS120が挙げられる。SeV M蛋白質のA183に相当する各M蛋 白質の相同部位としては、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)であればA183 、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)であれなF187、phocine distemper vir us (PDV)およびcanine distemper virus (CDV)であればY171、dolphin molbilliv irus (DMV)であればY172、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)およびrinderpest virus (RPV)であれはY171、Hendra virus (Hendra) およびNipah virus (Nipah)であればY187、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)であれはY184、simian parainfluenza virus 5 (SV5)であればF184、human par ainfluenza virus-4a (HPIV-4a)およびhuman parainfluenza virus-4b (HPIV-4b) であれはF188、mumps virus (Mumps)であればF186、Newcastle disease virus (N DV)であればY187が挙げられる。ここに挙げたウイルスにおいて、それぞれのM蛋

白質に上記の3つの部位のいずれか、好ましくは任意の2部位の組み合わせ、さらに好ましくは3つの部位全てのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異M蛋白質をコードするゲノムを有するウイルスは、本発明において好適である。

アミノ酸変異は、所望の他のアミノ酸への置換であってよいが、好ましくは、 側鎖の化学的性質の異なるアミノ酸への置換である。例えばアミノ酸は、塩基性 アミノ酸(例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(例えばア スパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパ ラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性ア ミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニ ルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、β分岐アミノ酸(例えばスレオニ ン、バリン、イソロイシン)、および芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニ ルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などのグループに分類することがで きるが、あるアミノ酸について、そのアミノ酸が属するグループのアミノ酸以外 のアミノ酸に置換することなどが挙げられる。具体的には、塩基性アミノ酸であ れは、酸性または中性アミノ酸への置換、極性アミノ酸であれは非極性アミノ酸 への置換、20種の天然のアミノ酸の平均分子量より大きい分子量を持つアミノ酸 であれば、その平均分子量より小さいアミノ酸への置換、逆にその平均分子量よ り小さいアミノ酸であれば、それより大きいアミノ酸への置換などが挙げられる が、それに限定されない。例えばセンダイウィルスM蛋白質における G69E、T116A 、およびA183Sからなる群より選択される変異あるいはそれらと相同な位置に変異 を含む他のパラミクソウイルスのM蛋白質を用いることができる。ここでG69Eとは 、M蛋白質の69番目のアミノ酸GlyがGluに置換された変異、T116Aとは、M蛋白質の 116番目のアミノ酸ThrがAlaに置換された変異、A183Sとは、M蛋白質の183番目の アミノ酸AlaがSerに置換された変異を言う。すなわち、センダイウィルス M蛋白 質のG69、T116、およびA183あるいは他のウイルスM蛋白質の相同部位を、それぞ れGlu (E)、Ala (A)、およびSer (S) へ置換することができる。これらの変異は

組み合わせて有していることが好ましく、特に上記3変異の全てを保持していることがより好ましい。M遺伝子への変異の導入は、公知の変異導入方法に従って実施することができる。例えば実施例に記載のように目的の変異を入れたオリゴヌクレオチドを用いて導入することが可能である。

また、例えば麻疹ウィルスにおいては、M蛋白のモノクローナル抗体に対するエピトープが変化している温度感受性株のP253-505 (Morikawa, Y. et al., Kitasa to Arch. Exp. Med., 64; 15-30 (1991)) のM遺伝子配列を用いてもよい。また、S eV M蛋白質の116番目のThrに対応する麻疹ウィルスM蛋白質の104番目のThr、またはムンプスウィルスのM蛋白質の119番目のThrを他のアミノ酸(例えばAla)に置換してもよい。

本発明のベクターは、さらに好ましい態様においてはM遺伝子を欠損している。 M遺伝子の欠損とは、M遺伝子の機能が失われていることを言い、機能欠失型の変異を有するM遺伝子を持つ場合およびM遺伝子を欠失する場合を含む。M遺伝子の機能欠失型変異は、例えばM遺伝子の蛋白質コード配列を欠失させたり、他の配列を挿入することにより作製することができる。例えば、M蛋白質コード配列の途中に停止コドンを設計することができる(WOOO/09700)。本発明のベクターは、最も好ましくはM蛋白質のコード配列を完全に欠失している。M蛋白質のORFを欠失したベクターは、条件的変異M蛋白質をコードするベクターとは違い、任意の条件においてウイルス粒子を形成する能力を失っている。

本発明のベクターを製造するには、パラミクソウイルスのゲノムRNAを含むRNP の再構成に必要なウイルス蛋白質、すなわちN、P、およびL蛋白質の存在下、パラミクソウイルスのゲノムRNAをコードするcDNAを転写させる。転写によりネガティブ鎖ゲノム(すなわちウイルスゲノムと同じアンチセンス鎖)を生成させてもよく、あるいはポジティブ鎖(ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖)を生成させても、ウイルスRNPを再構成することができる。ベクターの再構成効率を高めるには、好ましくはポジティブ鎖を生成させる。RNA末端は、天然のウイルスゲノムと

同様に3'リーダー配列と5'トレイラー配列の末端をなるべく正確に反映させることが好ましい。転写産物の5'端を正確に制御するためには、例えば転写開始部位としてT7 RNAポリメラーゼ認識配列を利用し、該RNAポリメラーゼを細胞内で発現させればよい。転写産物の3'端を制御するには、例えば転写産物の3'端に自己切断型リボザイムをコードさせておき、このリボザイムにより正確に3'が切り出されるようにすることができる (Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。

外来遺伝子を容易に挿入できるようにするために、ゲノムRNAをコードするcDNA中に外来遺伝子を挿入するためのクローニングサイトを設計することができる。その部位は、例えばゲノムの蛋白質非コード領域の所望の位置であってよく、具体的には3'リーダー領域と3'に最も近いウイルス蛋白質ORFとの間、各ウイルス蛋白質ORFの間、および/または5'に最も近いウイルス蛋白質ORFと5'トレイラー領域の間に挿入することができる。M遺伝子を欠失するゲノムでは、その欠失領域にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。複数の外来遺伝子をゲノム中の別々の位置に挿入できるように、クローニングサイトは、ゲノム中の複数箇所に存在してもよい。

例えば粒子形成能を持たない組み換えウィルスRNPは、Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 57 8-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載等に準じて、次のようにして構築することができる。

外来遺伝子を組み込む場合は、まず目的の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA 試料を用意する。DNA試料は、 $25 ng/\mu$ 1以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミ ドと確認できることが好ましい。以下、NotI部位を利用してウィルスゲノムRNAを コードするDNAに外来遺伝子を挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcD NA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI 部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から目的の遺伝子断片をPCRにより増幅し回収する。2つのプライマーの5'部分にNotI部位を付加しておくことにより、増幅された断片の両端をNotI部位とする。ウイルスゲノム上に挿入された後の外来遺伝子のORFとその両側のウイルス遺伝子のORFとの間にE-I-S配列が配置されるように、プライマー中にE-I-S配列またはその部分を含めるようにする。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために 5'側に任意の2以上のヌクレオチド (好ましくはGCGおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT) を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側にスペーサー配列として任意の9塩基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバース側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド(好ましくはGC GおよびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはA CTT)を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、E-I-S配列を含む最終的なPCR増幅産物のNotI断片の鎖長が6の倍数になるように塩基数を設計する (いわゆる「6のルール (rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993; Calain, P. and Roux, L., J. Virol. 67:4822-4830, 1993)。このプライマーにE-I-S配列を付加する場合には、挿入断片ののオリゴDNAの3'側にセンダイウィルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCCT-3'(配列

番号:8)、I配列の相補鎖配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTTCTTACTACGG-3'(配列番号:9)、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバース側合成DNAの3'の末端とする

PCRは、Taqポリメラーゼまたはその他のDNAポリメラーゼを用いる通常の方法を用いることができる。増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシークエンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターを介さずにNotI部位に直接挿入し、組み換えセンダイウィルスcDNAを得ることも可能である。

例えば、組み換えセンダイウィルスゲノムcDNAであれば、文献記載の方法に準じて構築することができる (Yu, D. et al., Genes Cells 2: 457-466, 1997; Ha san, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997)。例えば、NotI制限部位を有する18bpのスペーサー配列 (5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3') (配列番号:10)を、クローニングされたセンダイウィルスゲノムcDNA (pSeV(+))のリーダー配列とN蛋白質のORFとの間に挿入し、デルタ肝炎ウィルスのアンチゲノム鎖 (antigenomic strand)由来の自己開製リボザイム部位を含むプラスミドpSeV18b(+)を得る (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820)。

さらに、例えばM遺伝子を欠損させたり、あるいは温度感受性変異を導入する場合、ゲノムRNAをコードするcDNAを制限酵素で消化して、M遺伝子を含むフラグメントを回収し、適当なプラスミドにクローニングする。M遺伝子の変異またはM遺伝子欠損部位の構築はこのプラスミド上で行う。変異導入には、例えば QuikChan ge™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) などを利用し

てKitに記載の方法に従って実施することができる。M遺伝子の欠損または欠失のためには、例えば PCR-ライゲーション方法の組み合わせで行い、M遺伝子のORF全部または一部を欠失させ、適宜適当なスペーサー配列で連結することができる。M遺伝子の変異体または欠失体が得られたら、これを含むフラグメントを回収し、もとの全長ゲノムcDNAのM遺伝子と置換することにより、M遺伝子に変異を持つウィルスゲノムcDNAを調製することができる。同様の方法で、例えばFおよび/またはHN遺伝子等に変異を導入することができる。

ゲノムRNAをコードするDNAを、上記のウイルス蛋白質存在下で細胞内で転写さ せることにより、本発明のベクターを再構成することができる。本発明は、本発 明のベクターの製造のための、本発明のベクターのウィルスゲノムRNAをコードす るDNAを提供する。また本発明は、本発明のベクターの製造に適用するための、該 ベクターのゲノムRNAをコードするDNAの使用に関する。マイナス鎖RNAウィルスの ゲノムcDNAからのウィルスの再構成は公知の方法を利用して行うことができる(W 097/16539; W097/16538; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Sc hnell. M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 199 5, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997 , J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Na tl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエ ンザ、水疱性口内炎ウィルス、狂犬病ウィルス、麻疹ウィルス、リンダーペスト ウィルス、センダイウィルスなどを含むマイナス鎖RNAウィルスまたはウイルス成 分となるRNPをDNAから再構成させることができる。これらの方法に準じて、本発 明のベクターを再構成させることができる。

具体的な手順は、(a)上記パラミクソウィルスゲノムRNA(ネガティブ鎖RNA

)またはその相補鎖(ポジティブ鎖)をコードするcDNAを、N、P、およびL蛋白質を発現する細胞で転写させる工程、(b)該細胞またはその培養上清から該ゲノムRNAを含む複合体を回収する工程、により製造することができる。転写されたゲノムRNAは N、L、およびP蛋白質の存在下で複製されRNP複合体を形成する。工程(a)を、該ゲノムがコードする改変F蛋白質を開裂するプロテアーゼの存在下で実施することにより、形成されたRNPが該細胞に接触する細胞へ伝達され、感染が広がりベクターが増幅する。この方法により、機能的なM蛋白質が存在しなくても、RNPの形態で本発明のベクターを製造することができる。

DNAからの最初のゲノムRNAの転写に必要なT7 RNAポリメラーゼ等の酵素は、これを発現するプラスミドやウイルスベクターの導入によって実施することができるし、または、例えば細胞の染色体にこの遺伝子の発現を誘導できるように組み込んでおき、ウイルス再構成時に発現を誘導することにより供給することもできる。またゲノムRNA、およびベクター再構成に必要なウイルス蛋白質は、例えばこれらを発現するプラスミドの導入によって供給する。これらのウイルス蛋白質の供給において、野生型またはある種の変異パラミクソウイルスなどのヘルパーウイルスを用いることもできるが、これらのウイルスの混入を招くため好ましくない。

ゲノムRNAを発現するDNAを細胞内に導入する方法には、例えば次のような方法 、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取 りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方 法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスに よって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Roche)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Roche #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貧食小胞に取り込

まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている(Graham, F. L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1)細胞と共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、35℃、15~24時間、2)DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3)沈殿混液中のDNA濃度が 20~30μg/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している(Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol, Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン(Sigma #D-9885 M.W. 5×10⁵)混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界(電極間のギャップ、電圧)の強さ、バッファーの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、ベクター再構成のためのDNAの細胞への導入には、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Ragent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Roche, Cat No. 1811169) が用いられるが、これらに制限されない

cDNAからのウイルスベクターの再構成は具体的には例えば次のようにして行う ことができる。

24穴から 6 穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿等で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび 100μ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLC-MK2

をほぼ100%コンフルエントになるまで培養し、例えば 1μ g/ml psoralen(ソラレン)存在下 UV照射処理を20分処理で不活化した、T7 RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウィルスvTF7-3 (Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 19 96)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、 $2\sim60\mu$ g、より好ましくは $3\sim20\mu$ gの組換えセンダイウィルスのゲノムRNAをコードするDNAを、ウィルスRNPの生成に必須なトランスに作用するウィルス蛋白質を発現するプラスミド($0.5\sim24\mu$ gのpGEM-N、 $0.25\sim12\mu$ gのpGEM-P、および $0.5\sim24\mu$ gのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect(QIAGEN社)を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。N、P、およびLをコードする発現ベクターの量比は 2:1:2 とすることが好ましく、プラスミド量は、例えば $1\sim4\mu$ gのpGEM-N、 $0.5\sim2\mu$ gのpGEM-P、および $1\sim4\mu$ gのpGEM-L程度で適宜調整する。

トランスフェクションを行った細胞は、所望により100μg/mlのリファンピシン (Sigma) 及びシトシンアラビノシド (AraC) 、より好ましくは40μg/mlのシトシンアラビノシド (AraC) (Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウィルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウィルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破砕した後、RNPを含む破砕物をLLC-MK2細胞に再度トランスフェクションして培養する。トランスフェクションは、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて細胞に導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA(Roche)、Superfect(QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER(Roche #1811169)などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる(Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. S

ci. USA 80: 3015)。RNPが導入された細胞では、RNPからのウイルス遺伝子の発現およびRNPの複製の過程が遂行しベクターが増幅する。得られた細胞溶解物を希釈して再増幅を繰り返すことにより、ワクシニアウィルスvTF7-3は完全に除去することができる。再増幅は、例えば3回上繰り返す。得られたRNPは-80℃で保存することができる。

ウィルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウィルスベクター等の再構成においては、サル腎由来LLC MK2細胞およびCV-1細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞、ヒト由来細胞等を使うことができる。これらの細胞に適当なエンベロープ蛋白質を発現させることで、その蛋白質をエンベロープに含む感染性ウィルス粒子を得ることもできる。

ウイルスゲノム中のM遺伝子が欠損または欠失していると、このウイルスが感染した細胞からはウイルス粒子が形成されないため、上記のような方法ではRNPまたはRNPを含む細胞として本発明のベクターを調製することはできても、ウイルス粒子としてベクターを調製することはできない。また、RNPのトランスフェクションを行った後は、細胞内で増殖したRNPは接触している細胞へのみ伝達されるため感染の拡大が遅く、高タイターのウイルスベクターを大量に調製するのは難しい。本発明は、本発明のベクターをウイルス粒子として産生するための方法を提供する。ウイルス粒子はRNPに比べ溶液中で安定であり、さらに感染性を持たせることによりトランスフェクション試薬などを必要とせず細胞に接触させるだけでベクターを標的細胞に導入することができるため、産業上の利用に特に優れている。本発明のベクターをウイルス粒子として産生する方法の1つは、条件的変異を有するM遺伝子を持つウイルスゲノムを用いて、許容条件下でウイルスを再構成させる方法である。すなわち、上記の工程(a)、あるいは上記工程(a)および(b)により得られた複合体を導入した細胞を培養する際に、許容条件下で行うことにより、M蛋白質を機能させ粒子を形成させることができる。条件的変異を有す

るM変異蛋白質をコードするゲノムRNAを含むウイルス粒子を製造する方法は、(i)該M変異蛋白質の許容条件下、細胞内でパラミクソウイルスのN、P、およびL蛋白質、および該ゲノムRNAを含むRNPを増幅させる工程、および(ii)該細胞の培養上清に放出されたウイルス粒子を回収する工程、を含む方法である。例えば温度感受性M変異蛋白質であれば、許容温度で培養する。

また、本発明のベクターをウイルス粒子として製造するもう1つの方法は、M蛋 白質を発現するヘルパー細胞を用いる方法である。本発明者らは、Mヘルパー細胞 を用いることによって、F蛋白質の開裂部位が他のプロテアーゼで切断される配列 に改変されており、さらにM遺伝子を変異または欠失するベクターをウイルス粒子 として産生させた。本発明の方法は野生型パラミクソウイルスなどのヘルパーウ イルスを必要としないため、M遺伝子を含んだ粒子形成能を持つウイルスが混入す ることがなく、本発明のベクターを純粋に調製することが可能である。本発明は 、(i)パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a)M蛋白質をコードする核酸 が変異または欠失しており、かつ(b)改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部 位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に 置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを有するウイルス粒子であって、(1) 該ウイルス粒子が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有し、(2) 宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失しており、(3) 該プロテアーゼの存在に依存して、該ゲノムRNAを有するウイルス粒子が導入さ れた細胞と接触する細胞に、該ゲノムRNAを導入する能力を有するウイルス粒子を 提供する。好ましい態様では、このウイルス粒子はウイルス粒子を産生しない。

機能的M蛋白質を発現する細胞中で本発明のウイルス粒子を製造する方法は、

- (i) パラミクソウイルスの野生型M蛋白質またはそれと同等の蛋白質を発現する 細胞において、該パラミクソウイルスのN、P、およびL蛋白質、および該ゲノムRN Aを含むRNPを増幅させる工程、
 - (ii) 該細胞の培養上清に放出されたウイルス粒子を回収する工程、

を含む方法である。野生型M蛋白質はウイルス粒子を形成させる活性を有する限り、ゲノムRNAと違うパラミクソウイルスに由来していてもよい。また、タグペプチド等が付加されていてもよいし、適当な発現ベクターから発現される際に、ベクター由来のリンカーペプチドが付加されていてもよい。このように野生型M蛋白質そのものでなくても、それと同等のウイルス粒子形成能を有する蛋白質を用いることができる。M発現細胞から産生されたウイルス粒子は、この細胞で発現させた、M蛋白質をエンベロープに含んでいるが、この蛋白質をコードする遺伝子は含んでいない。従って、このウイルスが感染した細胞では、もはや野生型M蛋白質は発現せず、ウイルス粒子を形成できない。

M蛋白を発現するヘルパー細胞の作製は、以下のように行うことができる。例えばM遺伝子の誘導的な発現が可能なベクターを構築するため、誘導性プロモーターまたはCre/loxPなどの組み換えによる発現制御系などを利用する。Cre/loxP誘導型発現プラスミドの構築には、例えば、Cre DNAリコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現されるように設計されたプラスミドpCALNdlw (Arai, T. et al., J. Virology 72, 1998, p1115-1121) 等を利用することができる。M蛋白質を発現できる細胞として、M遺伝子が染色体に組み込まれ、誘導によりM蛋白質を持続的に高発現可能なヘルパー細胞株を樹立することが好ましい。細胞は、例えばサル腎臓由来細胞株LLC-MK2細胞等を用いることができる。LLC-MK2細胞は、10%の熱処理した不動化ウシ胎児血清(FBS)、ペニシリンGナトリウム 50単位/ml、およびストレプトマイシン 50μg/mlを添加したMEMで37℃、5% CO₂で培養する。Cre DNAリコンビナーゼによりM遺伝子産物を誘導発現されるように設計された上記プラスミドを、リン酸カルシウム法(mammalian transfection kit (Stratagene))により、周知のプロトコールに従ってLLC-MK2細胞に遺伝子導入を行う。

例えば、10cmプレートを用い、40%コンフルエントまで生育したLLC-MK2細胞に $10\,\mu\,\mathrm{g}$ のM発現プラスミドを導入後、 $10\mathrm{m}10$ 10% FBSを含むMEM培地にて、37^{\circ}Cの 5 %CO₂ インキュベーター中で24時間培養する。24時間後に細胞をはがし、 $10\mathrm{m}1$ 培

地に懸濁後、10 cmシャーレ 5 枚を用い、5 ml 1 枚、2 ml 2 枚、0.2 ml 2 枚に蒔き、64 18 (GIBCO-BRL) を 1200μ g/mlを含む10 ml の10 MFBSを含むMEM培地にて培養を行い、2 日毎に培地交換しながら、14 日間培養し、遺伝子の安定導入株の選択を行う。 該培地により生育してきた6418 に耐性を示す細胞はクローニングリングを用いて回収する。回収した各クローンは10 cmプレートでコンフルエントになるまで拡大培養を続ける。

ヘルパー細胞においてM蛋白質が高発現することが、高力価のウイルスを回収するために重要である。そのためには、例えば上記のM発現細胞の選択を2回またはそれ以上行うことが好ましい。例えばある薬剤耐性マーカー遺伝子を持つM発現プラスミドをトランスフェクションし、その薬剤を用いてM遺伝子を保持する細胞を選択した後、別の薬剤耐性マーカー遺伝子を持つM発現プラスミドを再度、この細胞にトランスフェクションしこの別の薬剤耐性マーカーで細胞を選択することにより、1回目のトランスフェクションで選択された細胞よりも、さらにM蛋白質を高発現できる細胞を選択することが可能である。このように、2回のトランスフェクションを経て構築されたMへルパー細胞を好適に用いることができる。Mへルパー細胞は、同時にF遺伝子も発現することにより、FおよびM遺伝子の両方を欠損する感染性ウイルス粒子を産生させることができる(WOO3/025570)。この場合、F遺伝子の発現プラスミドも2回以上トランスフェクションし、F蛋白質の発現誘導レベルをより高めることが好ましい。F遺伝子としては、本明細書に記載したような改変F蛋白質の遺伝子の用いることができる。

M蛋白質の発現誘導は、細胞を6cmシャーレにてコンフルエントまで生育させた後、例えば、アデノウィルスAxCANCreを斉藤らの方法(Saito et al., Nucl. Aci ds Res. 23: 3816-3821 (1995); Arai, T. et al., J. Virol. 72,1115-1121 (1998)) により、好ましくは moi=3 程度で感染させて行う。

野生型M蛋白質またはそれと同等の蛋白質を発現する細胞(Mへルパー細胞)を 用いて本発明のウイルス粒子を産生させるには、この細胞に上述した本発明のRNP を導入して培養すればよい。RNPの導入は、例えばRNPを含む細胞溶解物などをMへルパー細胞にトランスフェクションしてもよいし、あるいはRNPを産生する細胞とMヘルパー細胞とを共培養することによっても、細胞融合によりMヘルパー細胞にRNPを導入することができる。あるいは、Mヘルパー細胞内で、ゲノムRNAを転写させ、N、P、およびL蛋白質の存在下でRNPを新規に形成させてもよい。

本発明においては、上記の工程(i)(Mへルパー細胞でRNPを増幅させる工程)。 を低温で行うことが好ましい。温度感受性変異M蛋白質を用いたベクター産生では、ウイルス粒子産生過程を許容温度以下で行うことが必要であるが、驚くべきことに、野生型M蛋白質を用いた本方法においても、ウイルス粒子を形成させる過程を低温で行うことで効率的な粒子形成を行わせることが可能であることが判明した。低温とは、具体的には35℃以下、より好ましくは34℃以下、さらに好ましくは33℃以下、最も好ましくは32℃またはそれ以下である。

M欠失型のウィルスゲノムcDNAから組み換えウィルスベクターを再構成させるためのより好ましい一態様としては、以下のような方法が挙げられる。すなわち、

- (a) ゲノムRNA (ポジティブ鎖でもネガティブ鎖でもよい) をコードするDNAを、感染性ウィルス粒子の形成に必要なウィルス蛋白質群 (すなわちNP、P、L、M、F、およびHN蛋白質) を発現する細胞で転写させる工程、(b) 該細胞と、染色体に組み込まれたM遺伝子が発現する細胞 (Mヘルパー細胞) を共培養する工程、(
- c) 該培養から細胞抽出物を調製する工程、(d) 該抽出物を染色体に組み込ま

れたM遺伝子が発現する細胞(Mヘルパー細胞)にトランスフェクションして培養する工程、および (e) 該培養上清からウィルス粒子を回収する工程、を含む方法である。工程 (d) は上記の低温条件にて行うことが好ましい。得られたウイルス粒子は、再度Mヘルパー細胞に感染させて(好ましくは低温で)増幅することができる。具体的には、実施例の記載に従ってウィルスを再構成させることができる。回収したウイルス粒子は、希釈後、再度Mヘルパー細胞に感染させて増幅することができる。この増幅過程は例えば2または3回またはそれ以上行うことができる。得られたウィルスストックは−80℃で保存することができる。ウィルスカ価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endopoint 希釈法」により決定することができる。

具体的には、まずLLC-MK2細胞を 5×106 cells/dishで100mmのシャーレに播く 。T7 RNAポリメラーゼによりゲノムRNAの転写を行わせる場合には、細胞培養24時 間後、ソラレン (psoralen) と長波長紫外線 (365nm) で20分間処理したT7ポリメ ラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス (PLWUV-VacT7: Fuerst, T. R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986)) をMOI 2程度で 室温で1時間感染させる。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、ゲノムRNAを発現す るプラスミド、およびパラミクソウイルスのそれぞれN、P、L、F、およびHN蛋白 質を発現する発現プラスミド適当なリポフェクション試薬と用いてこの細胞にト ランスフェクトする。プラスミドの量比は、例えば順に 6:2:1:2:2:2 とす ることができるがこれに限定されない。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗 浄し、 40μ g/mLの Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5μg/mLのTrypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含むMEMで培養す る。24時間培養後、約8.5×10⁶ cells/dishあたりにM蛋白を持続発現する細胞(Mヘルパー細胞) を重層し、40μg/mLの AraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで 更に2日間37℃で培養する (P0)。これらの細胞を回収し、ペレットを2mL/dish あたりの Opti-MEMに懸濁する。凍結融解を3回繰り換えした後、ライゼートをそ のままMへルパー細胞にトランスフェクションし、40μg/mLの AraC、およびF蛋白質を開裂できるプロテアーゼを含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養する(P1)。3~14日後培養上清の一部をとり、新たに調製したMへルパー細胞に感染させ、40μg/mLの AraCおよび該プロテアーゼを含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養する(P2)。3~14日後に新たに調製したMへルパー細胞に再度感染させ、該プロテアーゼの存在下(F開裂型ウイルスを調製する場合)または非存在下(F非開裂型ウイルス粒子を調製する場合)、血清を含まないMEMを用い32℃で3~7日間培養する(P3)。このように再増幅を3回以上繰り返すことにより、最初に用いたワクシニアウィルスは完全に除去することができる。回収した培養上清に終濃度1%になるようにBSAを添加し-80℃にて保存する。

本発明のウイルス粒子は、ウイルス粒子が持つ改変F蛋白質が開裂された感染性を有する粒子、あるいは、そのままでは感染性を有さないが、該改変F蛋白質を開裂するプロテアーゼの処理により感染性を示す潜在的感染能を有するウイルス粒子であってよい。ウイルス粒子のエンベロープには、ゲノムがコードする改変F蛋白質が存在しているが、該蛋白質が開裂されていない場合は、そのままでは感染性を有さない。このようなウイルスは、この改変F蛋白質の開裂配列を切断できるプロテアーゼで処理するか、あるいは該プロテアーゼの存在下で細胞または組織に接触させることにより、該F蛋白質が開裂し感染性を獲得する。改変F蛋白質が開裂していないウイルス粒子を得るには、上記のウイルス産生細胞においてウイルスを製造する際に、その最終段階におけるウイルス増幅を改変F蛋白質を開裂するプロテアーゼの非存在下で行うことにより実施することができる。逆に該プロテアーゼの存在下でウイルスを調製することにより下蛋白質が開裂した感染性ウイルス粒子を調製することができる。

またウイルス粒子の製造過程において、細胞においてウイルスゲノムがコード していないエンベロープ蛋白質を発現させ、この蛋白質をエンベロープに含むウ イルス粒子を産生させることができる。このようなエンベロープ蛋白質としては 例えば野生型F蛋白質が挙げられる。このようにして産生したウイルス粒子は、ゲノムRNAには改変F蛋白質をコードしているが、エンベロープにはこの蛋白質に加え野生型F蛋白質も有する。ウイルス粒子の製造段階において野生型F蛋白質をトランスに供給し、これを開裂するトリプシン存在下で増幅させることにより、ウイルス粒子の野生型F蛋白質を開裂して感染性を獲得させることができる。この方法によれば、改変F蛋白質を開裂するプロテアーゼを用いなくても感染性ウイルス粒子を高タイターで調製することが可能となる。このように本発明のウイルス粒子としては、パラミクソウイルスの野生型F蛋白質を含むウイルス粒子であってよい。野生型F蛋白質は、ウイルスゲノムと同一種に由来しなくても、他のパラミクソウイルスのエンベロープ蛋白質であってよい。

また野生型F蛋白質でなくても、所望のウイルスエンベロープ蛋白質をエンベロープに有するウイルス粒子を作製してよい。すわなちウィルス再構成の際に、所望のエンベロープ蛋白質を細胞で発現させることにより、このエンベロープ蛋白質を有するウィルスベクターを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はない。例えば水疱性口内炎ウィルス(VSV)のG蛋白質(VSV-G)などは好適である。本発明のウイルス粒子には、VSV-G蛋白質などのように、ゲノムRNAが由来するウィルス以外のウィルスに由来するエンベロープ蛋白質を含むシュードタイプウィルスベクターが含まれる。この場合も上記野生型F蛋白質の場合と同様、ウイルスのゲノムRNAにはこのエンベロープ蛋白質はコードされないため、ウイルス粒子が細胞に感染した後は、ウイルスベクターからこの蛋白質が発現されることはない。

また、本発明のウィルス粒子は、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、抗体またはその断片、あるいはこれらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウィルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラ蛋白質などを含むものであってもよい。これにより、特定の組織を標的として感染するベクターを作り出すこともできる。

これらはウィルスベクターの再構成時に、細胞内で発現させることによりトランスに供給することができる。具体的には、例えばサイトカインなどの可溶性因子の受容体結合ドメインを含む断片、または細胞表面蛋白質に対する抗体断片などが挙げられる(W001/20989)。

なお、ウィルス遺伝子欠損型ベクターを調製する場合、例えば、ベクターに含まれるウィルスゲノム上で欠損しているウィルス遺伝子が異なる2種またはそれ以上のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するウィルス蛋白質が、他のベクターからの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウィルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウィルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、ウィルス蛋白質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのウィルス遺伝子欠損型ウィルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウィルスは、ウィルス遺伝子が欠損しているため、ウィルス遺伝子を欠損していないウィルスに比べゲノムサイズが小さくなりサイズの大きい外来遺伝子を保持することができる。また、ウィルス遺伝子の欠損により増殖性がないこれらのウィルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることから、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

また、大量にウィルスベクターを得るために、上記の方法で得られたウィルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる可能性もある。例えばニワトリを使ってM遺伝子のトランスジェニック体を作製し、この鶏卵にベクターを接種して増幅させればよい。鶏卵を使ったウィルスベクターの製造の基本的な方法は既に開発されている(中西ら編、(1993)、「神経科学研究の先端技術プロトコールIII、分子神経細胞生理学」、厚生社、大阪、pp. 153-172)。具体的には、例えば、受精卵を培養器に入れ9~12日間 37~38℃で培養し、胚を成長させる。ウィルスベクターを尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウィルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、増幅する組み換えウィルスにより変

わり得る。その後、ウィルスを含んだ尿液を回収する。尿液からのウィルスベクターの分離・精製は常法に従って行うことができる(田代眞人,「ウィルス実験プロトコール」,永井、石浜監修,メジカルビュー社,pp.68-73(1995))。

回収したウィルスベクターは実質的に純粋になるよう精製することができる。精製方法はフィルトレーション(濾過)、遠心分離、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。「実質的に純粋」とは、ウィルスベクターが、それが存在する試料中の成分として主要な割合を占めることを言う。典型的には、実質的に純粋なウィルスベクターは、試料中に含まれる全蛋白質(但しキャリアーや安定剤として加えた蛋白質は除く)のうち、ウィルスベクター由来の蛋白質の割合が10%以上、好ましくは20%以上、より好ましくは50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を占めることにより確認することができる。パラミクソウィルスの具体的な精製方法としては、例えばセルロース硫酸エステルまたは架橋ポリサッカライド硫酸エステルを用いる方法(特公昭62-30752号公報、特公昭62-33879号公報、および特公昭62-30753号公報)、およびフコース硫酸含有多糖および/またはその分解物に吸着させる方法(W097/32010)等を例示することができる

F開裂部位が改変されたM遺伝子欠失型のベクターは、特定のプロテアーゼが存在する環境下でのみ、細胞融合型の感染によりベクターを細胞間に伝達する。従って、本発明のベクターは、あるプロテアーゼを発現する組織を標的にした遺伝子治療に有用である。通常のベクターでは、標的組織の表層に遺伝子導入することはできても、組織内部にまでベクターを浸透させることは難しい。しかし本発明のベクターは、標的とするプロテアーゼ活性が亢進している組織内にベクターを深く浸潤させる能力を持っている。例えば正常組織の深部まで浸潤した癌細胞に対しても、本発明のベクターを用いることにより、癌細胞の一部のベクター感染可能な表層部分にそのベクターを感染させることによって、標的細胞の内部ま

でベクターを伝達する事が可能である。

疾患への適用としては、癌、動脈硬化、および慢性関節リウマチ (RA) をはじめとする関節疾患などが挙げられる。例えばRA等の関節疾患では、上記のように細胞外マトリックス分解による軟骨高次構造の崩壊が進行し関節が破壊される。本発明のベクターによりECM分解酵素活性が亢進した細胞を取り除くことにより、関節破壊を低下させることが期待される。また、動脈硬化においては、マクロファージ由来泡沫細胞の集簇が進行する。泡沫細胞はメタロプロテアーゼを大量に分泌し、その結果線維性肥厚を破壊しプラーク破綻を引き起こす。本発明のベクターを用いてMMPを発現するマクロファージを殺すことにより、このような動脈硬化の治療を行うことが可能と考えられる。また後述のように、癌においては種々のプロテアーゼが活性化している。本発明のベクターは、癌特異的に感染・浸潤する治療ベクターとして有用である。

ベクターを含む組成物の製造においては、ベクターは必要に応じて薬理学的に許容される所望の担体または媒体と組み合わせることができる。「薬学的に許容される担体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。例えばベクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などで適宜希釈して組成物とすることができる。ベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては尿液を含んでよい。またベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の担体または媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。本発明のベクターを含む組成物は試薬として、および医薬として有用である。

ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与 組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決 定することが可能である。投与されるベクター量は好ましくは約10⁶ CIU/mlから約 10¹¹ CIU/ml、より好ましくは約10⁷ CIU/mlから約10⁸ CIU/ml、最も好ましくは約1×10⁸ CIU/mlから約5×10⁸ CIU/mlの範囲内の量を薬学上容認可能な担体中で投与することが好ましい。癌組織等に投与する場合、ベクターの投与は標的部位に均等に行きわたるよう複数箇所に投与することができる。ヒトにおいては1回当たりの投与量は2×10⁵ CIU~2×10¹⁰ CIUが好ましく、投与回数は、1回または臨床上容認可能な副作用の範囲で複数回可能であり、1日の投与回数についても同様である。ヒト以外の動物についても、例えば目的の動物とヒトとの体重比または投与標的部位の容積比(例えば平均値)で上記の投与量を換算した量を投与することができる。本発明のベクターを含む組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

特に本発明のベクターは癌の治療に有用である。本発明のベクターが感染した細胞では、プロテアーゼ存在下で細胞融合によりシンシチウムを形成させる。この性質を利用して、本発明のベクターを特定のプロテアーゼの活性が亢進している癌の治療に用いることが可能である。本発明は、癌で活性が亢進するプロテアーゼにより開裂するF蛋白質をコードする本発明のベクターおよび薬学的に許容される担体を含む癌の治療組成物を提供する。また本発明は、該ベクターの癌治療組成物の製造における使用に関する。また本発明は、該ベクターを癌に投与する工程を含む、癌の治療方法を提供する。浸潤転移する悪性の癌ではECM分解酵素の活性が亢進していることから、ECM分解酵素により開裂するF蛋白質遺伝子を有するベクターを用いれば、悪性の癌に特異的にベクターを感染させ癌組織を死滅させることができる。

ベクターには、外来遺伝子を搭載させることができる。外来遺伝子は、ベクターの感染をモニターするためのマーカー遺伝子であってもよく、あるいは癌の治療用遺伝子を用いてもよい。治療用遺伝子としては、例えばアポトーシス等の細胞誘導性遺伝子、細胞毒性を持つ蛋白質をコードする遺伝子、サイトカイン、ホルモン、その他が挙げられる。本発明のベクターは、癌への直接(in vivo)投与

、および患者由来細胞またはそれ以外の細胞に本発明のベクターを導入し、その細胞を癌に注入する間接 (ex vivo) 投与により癌に投与することができる。

対象となる癌は特定のプロテアーゼ活性が亢進する所望の癌であってよく、癌種としてはほとんどの浸潤転移する悪性の腫瘍(肺癌、胃癌、大腸癌、食道癌、乳癌など)が挙げられる。しかし、悪性癌においてもMMP、uPA、tPAなどのプロテアーゼの発現の低いものもあるため、プロテアーゼ活性の亢進の有無によって適用を判断する。食道癌における粘膜下層への浸潤癌、大腸癌における固有筋層へのIII、IV期の進行癌や、浸潤性のメラノーマの深部に進入した外科的にとりきれない癌への適用に、本発明のベクターは特に優れている。

図面の簡単な説明

図1は、M遺伝子に温度感受性変異を導入したF欠失型SeVゲノムcDNAの構築スキームを示す図である。

図2は、M遺伝子への温度感受性変異導入による2次放出粒子抑制を目的として 構築したウィルス遺伝子及びその変異導入の効果を比較検討する為に構築した或 いは使用したウィルス遺伝子の構造を示す図である。

図3は、SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPを、F蛋白を持続発現する細胞 (LLC-MK2/F7/A) に感染し、それぞれ32℃及び37℃で6日間培養後のGFP発現を示す顕微鏡像を示す写真である。

図4は、SeV-F蛋白を持続発現する細胞(LLC-MK2/F7/A)について、32℃或いは37℃でtrypsin及び血清を含まないMEMで培養し経時的にF蛋白の発現量をWestern-blottingで半定量的に観測した結果を示す写真である。

図 5 は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP, SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPをm.o.i. 3で感染し32℃, 37℃或いは38℃で培養し3日後のGFP発現を示す顕微鏡像を示す写真である。

図6は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP, SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNts ΔF-G

FPをm.o.i.3で感染し32℃,37℃或いは38℃で培養し経時的にサンプリング(同時に新しい培地に交換)した培養上清の赤血球凝集活性(HA活性)を示す図である

図7は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP、SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPをm.o.i.3で感染し、37℃で培養2日後の培養上清及び細胞を回収して、1 lane 当96 well plate培養1well分の1/10相当量を用いて、抗M抗体を利用したWester n-blottingにより求めた、細胞内とウィルス様パーティクル (VLP) 間のM蛋白の存在比率を示す写真である。

図8は、LLC-MK2細胞にSeV18+SEAP/ Δ F-GFP或いはSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFPをm.o.i.3で感染し、培養12, 18, 24, 50, 120時間後にサンプリングした培養上清を用いて測定したSEAP活性を示す図である。

図9は、LLC-MK2細胞にSeV18+SEAP/ Δ F-GFP或いはSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFPをm.o.i. 3で感染し、培養24,50,120時間後にサンプリングした培養上清のHA活性を示す図である。

図10は、LLC-MK2細胞にSeV18+SEAP/ Δ F-GFP或いはSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFPをm. o! i. 3で感染し、培養5日後にサンプリングした培養上清について遠心後ウィルスを回収し、1 lane当り6 well plate培養1well分の1/10相当量を用いて、抗M抗体を利用したWestern-blottingにより求めたウィルス様パーティクル量を示す写真である。

図11は、LLC-MK2, BEAS-2B或いはCV-1細胞に SeV18+ / Δ F-GFP或いはSeV18+/ MtsHNts Δ F-GFPをm.o.i. 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10で感染し、血清を含まない或いは10% FBSを含む培地で培養し、血清を含まない培地の場合は感染3日後に、10% FBSを含む培地の場合は感染6日後に、培地中に放出されたLDH量から見積った細胞障害性を示す図である。同じ細胞数の細胞を細胞変性剤(Triton)を用いて100% lysis した時の値を100%とした相対値で表した。

図12は、LLC-MK2細胞にSeV18+GFP, SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNtsΔ

F-GFPをm.o.i. 1で感染し、32℃, 37℃或いは38℃で培養し、培養2日後に抗M抗体を利用して免疫染色を行うことにより求めたM蛋白の細胞内局在を示す写真である。

図13は、A-10細胞にSeV18+SEAP/ΔF-GFP或いはSeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFPをm.o.i. 1で感染し、32℃或いは37℃で培養し、10%血清を含む培地で培養1日後に抗M抗体および抗HN抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察したM蛋白及びHN蛋白の細胞内局在を示す写真である。ステレオ立体画像で示した。

図14は、A-10細胞にSeV18+SEAP/ΔF-GFP或いはSeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFPをm.o.i. 1で感染し、32℃或いは37℃で培養し、10%血清を含む培地で培養2日後に抗M抗体および抗HN抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察したM蛋白及びHN蛋白の細胞内局在を示す写真である。ステレオ立体画像で示した。

図15は、M蛋白及びHN蛋白の細胞内局在に及ぼす微小管脱重合試薬の効果を示す写真である。A-10細胞にSeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFPをm.o.i. 1 で感染し、直後に微小管の脱重合試薬であるコルヒチン (colchicine) 或いはコルセミド (colcemide) を終濃度1μMになるように添加し、32℃で培養した。10%血清を含む培地で培養2日後に抗M抗体及び抗HN抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察したM蛋白及びHN蛋白の細胞内局在を観察した。ステレオ立体画像で示した。

図16は、M蛋白及びHN蛋白の細胞内局在に及ぼす微小管脱重合試薬の効果を示す写真である。A-10細胞にSeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPをm.o.i. 1 で感染し、直後に微小管の脱重合試薬である colchicineを終濃度 1μM になるように添加し、32℃或いは37℃で培養した。10%血清を含む培地で培養2日後に抗M抗体及び抗HN抗体を利用して免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を利用して観察したM蛋白及びHN蛋白の細胞内局在を観察した。ステレオ立体画像で示した 図17は、EGFP遺伝子を有するM欠失型SeVゲノムcDNAの構築スキームを示す図である。

図18は、F及びM両欠失型SeVゲノムcDNAの構築スキームを示す図である。

図19は、構築したFおよび/またはM欠失型SeV遺伝子の構造を示す図である。

図20は、hygromycin耐性遺伝子を有するM遺伝子発現プラスミドの構築スキー ムを示す図である。

図21は、クローニングしたM(及びF)蛋白を誘導発現する細胞について、Cre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウィルス(AcCANCre)を感染後、Western-blottingによるM及びF蛋白の半定量的な発現比較を示す写真である。

図22は、ヘルパー細胞 (LLC-MK2/F7/M) クローン#18及び#62を用いたM欠失型 SeV (SeV18+/ Δ M-GFP) のウィルス再構成を示す写真である。

図23は、SeV18+/ΔM-GFPのウィルス生産性 (CIUとHAUの経時変化) を示す図である。

図 2 4 は、SeV18+/ Δ M-GFPのビリオン中の遺伝子構造確認の為のRT-PCRの結果を示す写真および図である。

図25は、SeV18+/ Δ M-GFPのウィルス構造を蛋白の視点から確認する為に、LL C-MK2細胞に感染後の細胞及び培養上清中のウィルス蛋白についてWestern-blottingを行い、SeV18+GFP及びSeV18+/ Δ F-GFPとの比較結果を示す写真である。

図26は、SeV18+/ Δ M-GFP及びSeV18+/ Δ F-GFP感染LLC-MK2細胞培養上清中のウィルス由来蛋白の定量比較(希釈系列を作製してWestern-blotting)を示す写真である。抗SeV抗体(DN-1)を用いた。

図27は、SeV18+/ΔM-GFP或いはSeV18+/ΔF-GFPをLLC-MK2にm.o.i.3で感染し 、経時的に回収した培養上清中のHA活性を示す図である。

図28は、SeV18+/ΔM-GFP或いはSeV18+/ΔF-GFPをLLC-MK2にm.o.i.3で感染し 感染5日後の蛍光顕微鏡像を示す写真である。 図29は、SeV18+/ΔM-GFP或いはSeV18+/ΔF-GFPをLLC-MK2にm.o.i.3で感染し、感染5日後に回収した培養上清について、カチオニックリポソーム (Dosper)を用いてLLC-MK2にトランスフェクションした2日後の蛍光顕微鏡像を示す写真である。

図30は、F1/F2の開裂部位 (F蛋白質の活性化部位) のアミノ酸配列のデザインを示す図である。癌細胞で高発現しているプロテアーゼ (MMP或いはuPA) の認識配列を合成基質の配列を元にデザインした。上から順に配列番号:40~44

図31は、Fの活性化部位を変換したM欠失型SeVベクターのcDNA構築スキームを示す図である。

図32は、F改変M欠失型センダイウイルスベクターによるプロテアーゼ依存的 細胞融合型感染を示す写真である。

LLC-MK2を用いて、Fの改変によってそのプロテアーゼ依存的に細胞融合型感染が成立しているかを確かめた。SeV/ΔM-GFP (A, B, C, J, K, L) 、SeV/F (MMP#2) ΔM-GFP (D, E, F, M, N, 0) 、SeV/F (uPA) ΔM-GFP (G, H, I, P, 0, R) の各M欠失型のSeVを細胞に感染させ、同時に 0.1 μ g/ml collagenase (Clostridium) (B, E, H), MMP2 (C, F, I), MMP9 (J, M, P), uPA (K, N, Q), 7.5 μ g/ml Try psin (L, Q, R) を加えた。4日後、蛍光顕微鏡で観察した。Fを改変していないSeV/ΔM-GFPは、trypsinを加えたLLC-MK2でのみ、感染した細胞の周りの細胞と細胞融合をおこし、細胞融合型感染がみられ、多核細胞であるsynthitiumを形成した (L)。MMP 分解配列をFに組み込んだSeV/F (MMP#2) ΔM-GFPは、collagenase、MMP 2, MMP9 を加えたLLC-MK2で、細胞融合型感染がみられ、多核細胞であるsynthitiumを形成した (E, F, M)。一方、urokinase-type plasminogen activator (uPA), tissue-type PA (tPA) 分解配列をFに組み込んだSeV/F (uPA) ΔM-GFPでは、trypsinで細胞融合型感染がみられ、さらに改変したことによってuPAで多核細胞であるsynthitiumを形成した (Q, R)。

図33は、F改変M欠失型センダイウイルスベクターによる癌細胞のプロテアー ゼ依存的細胞融合型感染を示す写真である。

MMP発現癌細胞株であるHT1080(A, D, G) 、tPA発現株であるMKN28(B, E, H) 、どちらのプロテアーゼも発現していない細胞株SW620(C, F, I) を用いて、内在性のプロテアーゼ選択的に細胞融合型感染がみられるかどうか実験をおこなった。troothing HT1080ではtroothing SeV/F (MMP#2)troothing MMP (MMP#2)troothing MMP (MMP#2)troothing MMP (MMP#2)troothing MMP (MMP#2) troothing MMP (

図34は、Phorbol EsterによるMMP誘導とF改変M欠失型センダイウイルスベクターの細胞融合型感染の誘導を示す写真である。

MMP2, 9の発現をgelatin分解活性がある部分が白くぬけるgelatin zymography 法によって確認した (A) 。レーンCが対照 (control) , Tが20 nM PMAによって誘導された上澄みを用いたもので、HT1080とPanc IでMMP9のバンドが確認され、MMP 9が誘導されていることがわかる。MMP2は、Panc I で誘導前に潜在型(Iatent)のIMP2が検出されているがそれは潜在型であるため活性がほとんどない。IBが示すように、ISeV/IF (IMMP) IMP2 IMMP9 IMP3 IMP3 IMP9 IMP3 IMP3 IMP3 IMP3 IMP3 IMP3 IMP3 IMP3 IMP4 IMP3 IMP4 IMP

図35は、in vivoにおけるF改変M欠失型センダイウイルスベクターの細胞融合型感染を示す写真である。

HT1080の担癌ヌードマウスを作製した。皮下に注射後、7~9日後に長径が3 mm を越えた個体を用いた。 $50 \mu 1$ のSeVを1 度だけ注入した。2 日後、蛍光顕微鏡にて観察した。A, D, G, Jが明視野、B, E, H, Kがそれに対応するGFPの蛍光像、C, F, I, Lはその拡大像である。SeV-GFP、 $SeV/\Delta M$ -GFPは注入したまわりのみ蛍光がみられることが確認できる(パネル E, H)。それに対してSeV/F(MMP#2) ΔM -GFPでは癌全体に広がることが観察された(パネル K)。拡大したものでは、SeV-GF

P、SeV/ Δ M-GFPが細胞1つ1つの蛍光が確認されるのに対して、SeV/F(MMP#2) Δ M-GFPでは細胞の形がはっきりせず細胞融合していることが示唆された。

図36は、in vivoにおけるF改変M欠失型センダイウイルスベクターの細胞融合型感染を示す図である。図35の写真像におけるGFPの癌全体に対する割合をNIH imageによって面積から測定した。その結果、図に示すようにSeV-GFPが10%、SeV/ Δ M-GFPが20%であるのに対してSeV/F(MMP#2) Δ M-GFPでは90%の感染がみられ、明らかな感染の広がりが確認された。

図37は、担癌ヌードマウスによるF 改変M欠失型SeVベクターの抗腫瘍効果を示す図である。図35の腫瘍体積の大きさを計測した。3 mm以上に発達した癌に4群のSeVを注入した。2日後、再度注入し、癌の大きさを計測した。PBS, SeV-GFP, SeV/ΔM-GFPは急速に癌が大きくなるのに対して、図36で示したように癌全体に広がっていたSeV/F(MMP#2)ΔM-GFPを注入した癌は明らかに増殖せず小さいままであった。t検定によりP<0.05で有意に他の3群と比較して抗癌効果がみられた

図38は、F非開裂型F 改変M欠失型SeVベクターの癌細胞へのプロテアーゼ発現 選択的感染を示す写真である。

MMP発現株HT1080、tPA発現株MKN28、プロテアーゼをほとんど発現していないSW 620で、プロテアーゼ発現による選択的感染が可能かどうか調べた。SeV/F(MMP#2) Δ M-GFPはMMP発現株HT1080で感染がみられるが、tPA発現株MKN28では、感染がみられない。SeV/F(uPA) Δ M-GFPは、tPA発現株MKN28では感染がみられるが、MMP発現株HT1080では感染がみられない。

図39は、F非開裂F 改変M欠失型SeVベクターのfibroblast によるMMP3, 7の誘導による感染能の獲得を示す写真である。

SW480およびWiDrを使ってin vitroでfibroblastによるMMPの誘導でF改変M欠失型SeVベクターの感染が変化するかどうか調べた。SW480, WiDrともにhuman fibroblast (hFB) をco-cultureすることによって、SeV/F(MMP#2) Δ M-GFP が感染する

ようになった (B, D)。誘導のかからないSW620ではその現象はみられない (F)

図40は、ヒト大動脈平滑筋細胞へのF改変M欠失型SeVベクターのMMP選択的感染を示す写真である。SeV/ΔM-GFPではtrypsinを加えることによってのみ感染が亢進するのに対して、SeV/F(MMP#2) ΔM-GFPではcbllagenase, MMP2, MMP3, および MMP9でその感染が亢進する。

図41は、F改変M欠失型SeV ベクターのプロテアーゼ依存的Fの開裂を示す写真である。

プロテアーゼ依存的なセンダイウイルスのF0からF1への開裂をウェスターンブロッティングによって確認した。レーン 1, 4, 7, 10 がFを改変していないM欠失型SeV ベクター、レーン 2, 5, 8, 11がFにMMP#2配列を挿入したM欠失型SeV ベクター、レーン 3, 6, 9, 12がFにuPA配列を挿入したM欠失型SeV ベクターを上記のプロテアーゼ(未処理、レーン 1, 2, 3; 0.1 ng/ml MMP9、レーン 4, 5, 6; 0.1 ng/ml uPA、レーン 7, 8, 9; $7.5\,\mu\,\mathrm{g/ml}$ trypsin、レーン 10, 11, 12)で37℃、30分間処理した。その結果、trypsinがFを改変していないM欠失型SeV ベクターを、MMP9がFにMMP#2配列を挿入したM欠失型SeVベクターを、uPAがFにuPA配列を挿入したM欠失型SeV ベクターを、uPAがFにuPA配列を挿入したM欠失型SeV ベクターをとれぞれ挿入したプロテアーゼ基質に従って、F1へ開裂させた。

図42は、Fの細胞質ドメイン欠失変異体 (cytoplasmic domain deletion mutant) の作製とHNとの同時発現による融合能の比較を示す図である。

A; センダイウイルスFタンパク質の細胞質ドメイン欠失変異体構築図。上から順 に配列番号:76~79。

B; Fの細胞質ドメイン欠失変異体の作製とHNとの同時発現による融合能の比較。7 $.5\,\mu\,\mathrm{g/ml}$ trypsin添加LLCMK2細胞へセンダイウイルスFタンパク質のそれぞれのcy toplasmic domain deletion mutantとHNを同時発現した後、4日後、hematoxylin によって核染色し、シンシチウム形成した核の数をカウントした。

図43は、F/HNキメラタンパクは融合能を飛躍的に上昇させることを示す図である。

A: F/HNキメラタンパク構造図。図中のリンカー配列は配列番号:80とした。
B: F/HN キメラタンパクはLinkerの挿入によって融合能が上昇する。7.5μg/ml t rypsin添加したLLCMK2細胞へそれぞれのセンダイウイルスF/HNキメラタンパクとH Nを同時発現させた。

図44は、F/HNキメラタンパクのF開裂部位へのMMP基質配列の挿入の概略を示す図および写真である。

A: MMP基質配列を挿入したF改変F/HNキメラタンパクの構築図。上から順に配列番号: 81~89。

B; MMP発現細胞HT1080へのF改変F/HNの発現によるシンシチウム形成。

図45は、Fペプチド (Fusion peptide) 改変と濃度依存的シンシチウム形成への影響を示す図である。

A: Fusion peptide改変構築図。上から順に配列番号: 90~93。

B: MMP#2, #6, #6G12Aのcollagenase(Clastridium)添加濃度による融合能。

図46は、改良型F改変M欠失型センダイウイルスのゲノム構造を示す図である

図47は、MMP発現量の低い癌においての改良型F改変M欠失型センダイウイルスの広がりを示す写真である。改良型F改変M欠失型センダイウイルス感染2日後の細胞融合のひろがりを示す。

図48は、癌細胞株におけるMMP2およびMMP9の発現を示す写真である。癌細胞株の上清のGelatin zymographyを示す。

図49は、MMP発現量の低い癌においての改良型F改変M欠失型センダイウイルスの広がりを示す図である。感染2日後の $0.3 cm^2$ あたりのシンシチウム数の比較を示す。「 Δ M」はSeV18+/ Δ M-GFP、「#2」はSeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP、「#6」はSeV/F(MMP#6) Δ M-GFP、「#6ct14」はSeV(TDK)/Fct14(MMP#6) Δ M-GFP、「F/HNキメラ

」はSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNΔM-GFPを表す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に よって制限されるものではない。なお、本明細書に引用された文献は全て本明細 書の一部として組み込まれる。

1. 粒子形成能を低下または欠損させたSeVベクターの構築

[実施例1] 温度感受性変異導入SeVゲノムcDNAの構築

M遺伝子に温度感受性変異を導入したSeVゲノムcDNAの構築を行った。下記記載 のcDNA構築のスキームを図1に表した。F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失 型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+/△F-GFP:Li, H.-O. et al., J. V irology 74, 6564-6569 (2000), WO00/70070) をNaeIで消化し、M遺伝子を含む断 片(4922bp)をアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN, Bothell, WA) で回収し、pBluescript II (St ratagene, La Jolla, CA) のEcoRVサイトにサブクローニングした (pBlueNaeIfr g-ΔFGFPの構築)。M遺伝子への温度感受性変異導入はこのpBlueNaeIfrg-ΔFGFP 上で、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) を利用してKitに記載の方法に従って行った。M遺伝子上への変異導入の種類はK ondoらが報告しているCl. 151 strain (Kondo, T. et al., J. Biol. Chem. 268: 21924-21930 (1993)) の配列を利用し、G69E, T116A及び A183Sの3箇所の変異導 入を行った。変異導入に使用した合成オリゴの配列は、G69E(5'-gaaacaaacaacca atctagagagcgtatctgacttgac-3'/配列番号:11,5'-gtcaagtcagatacgctctctaga ttggttgtttgtttc-3'/配列番号:12)、T116A(5'-attacggtgaggagggctgttcgag caggag-3'/配列番号: 13, 5'-ctcctgctcgaacagccctcctcaccgtaat-3'/配列番 号:14) 及び A183S (5'-ggggcaatcaccatatccaagatcccaaagacc-3'/配列番号: 15,5'-ggtctttgggatcttggatatggtgattgcccc-3'/配列番号:16) である。

M遺伝子上に3箇所の変異を有するpBlueNaeIfrg-ΔFGFPをSalIで消化後ApaLIで 部分消化を行い、全M遺伝子を含むフラグメント(2644bp)を回収した。一方でpS eV18+/ΔF-GFPをApaLI/NheIで消化してHN遺伝子を含む断片(6287bp)を回収し、 この2種の断片をLitmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) のSall/NheIサ イトにサブクローニングした (LitmusSalI/NheIfrg-Mts Δ FGFPの構築)。 HN遺伝 子への温度感受性変異導入はこのLitmusSalI/NheIfrg-Mts & FGFP上で、M遺伝子へ の変異導入時と同様にQuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kitを利用してKi tに記載の方法に従って行った。HN遺伝子上への変異導入の種類はThompsonらが報 告しているts271 strain (Thompson, S.D. et al., Virology 160: 1-8 (1987)) の配列を利用し、A262T、G264R及びK461Gの3箇所の変異導入を行った。変異導入 に使用した合成オリゴの配列は、A262T/G264R (5'-catgetetgtggtgacaacceggacta ggggttatca-3'/配列番号: 17,5'-tgataacccctagtccgggttgtcaccacagagcatg-3 '/配列番号:18)、及び K461G (5'-cttgtctagaccaggaaatgaagagtgcaattggtac aata-3'/配列番号:19,5'-tattgtaccaattgcactcttcatttcctggtctagacaag-3' /配列番号:20)である。今回はM或いはHN遺伝子への変異導入を別々のベクタ ー上で行ったが、pSeV18+/ΔF-GFPをSalI/NheIで消化し得られるM及びHN遺伝子を 含むフラグメント (8931bp) をLitmus38のSall/NheIサイトにサブクローニングし て得られるプラスミド (LitmusSalI/NheIfrg-ΔFGFP) を利用して、M及びHN遺伝 子への全変異を導入することは可能である。このようにして順次変異導入を行い 、M遺伝子上に3箇所、HN遺伝子上に3箇所の計6箇所の温度感受性変異を導入し た (LitmusSalI/NheIfrg-MtsHNtsΔFGFPの構築)。

LitmusSalI/NheIfrg-MtsHNts Δ FGFPをSalI/NheIで消化して回収したフラグメント (8931bp) と、またpSeV18+/ Δ F-GFPをSalI/NheIで消化して回収したM及びHN等遺伝子を含まないフラグメント (8294bp) をライゲーションして、M及びHN遺伝子に 6 箇所の温度感受性変異を有し、F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP) を構築した (図 2)

更に、搭載遺伝子発現量の定量を行う為に、分泌型アルカリホスファターゼ(S-EAP)遺伝子を搭載したcDNAの構築も行った。即ち、SEAP遺伝子の下流に終止シグナルー介在配列-開始シグナルを有するSEAP断片(W000/70070)をNotIで切り出し(1638bp)、電気泳動後回収・精製し、pSeV18+/ΔF-GFP及びpSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPのNotIサイトに組み込んだ。それぞれ、pSeV18+SEAP/ΔF-GFP及びpSeV18+SE AP/MtsHNts ΔF-GFPとした(図 2)。

[実施例2] 温度感受性変異導入ウィルスの再構成と増幅

ウィルスの再構成はLiらの報告 (Li, H.-0. et al., J. Virology 74. 6564-65 69 (2000), WOOO/70070) に従って行った。F欠失型ウイルスを再構成させるため、F蛋白のヘルパー細胞を利用した。当該ヘルパー細胞作製にはCre/loxP発現誘導システムを利用している。当該システムはCre DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988)) を利用したものであり、同プラスミドのトランスフォーマントにCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウィルス (Ax CANCre) をSaitoらの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998)) で感染させて挿入遺伝子を発現させる。SeV-F蛋白の場合、F遺伝子を有する同トランスフォーマント細胞をLLC-MK2/F7と記載し、AxCANCreで誘導後F蛋白を持続発現している細胞をLLC-MK2/F7/Aと記載することにする。

温度感受性変異導入ウィルスの再構成は以下のように行った。LLC-MK2細胞を 5 ×10⁶ cells/dishで100mmのシャーレに播き、24時間培養後、ソラレン(psoralen) と長波長紫外線(365nm)で20分間処理したT7ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウィルス(PLWUV-VacT7: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. A cad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986))を室温で1時間感染させた(m.o.i.2)。 細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラスミドpSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP, pG

EM/NP, pGEM/P, pGEM/L及びpGEM/F-HN (Kato, A. et al., Genes Cells 1, 569-5 79' (1996)) をそれぞれ12 μ g,4 μ g,2 μ g,4 μ g及び4 μ g/dishの量比で0pti-ME M (Gibco-BRL, Rockville, MD) に懸濁し、1μg DNA/5μL相当のSuperFect tran sfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) を入れて混合し、室温で15分間放置後 、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培 養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40μg/mLの Cytosine β-D-arabinofurano side (AraC: Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5 μ g/mLのTrypsin (Gibco-BRL, Rock ville, MD) を含むMEMで培養した。24時間培養後、8.5×106 cells/dishあたり にF蛋白を持続発現する細胞 (LLC-MK2/F7/A: Li, H.-O. et al., J. Virology 74 . 6564-6569 (2000), W000/70070) を重層し、40μg/mLの AraC及び7.5μg/mLのT rypsinを含むMEMで更に2日間37℃で培養した(P0)。これらの細胞を回収し、ペ レットを2mL/dishあたりの Opti-MEMに懸濁した。凍結融解を3回繰り返した後 、ライゼートをそのままLLC-MK2/F7/Aにトランスフェクションし、40μg/mLの Ar aC及び7.5μg/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養した(P1) 。5~7日後培養上清の一部をとり、新たに調製したLLC-MK2/F7/Aに感染させ、 同40 µ g/mLの AraC及び7.5 µ g/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32℃ で培養した(P2)。 $3\sim5$ 日後に新たに調製したLLC-MK2/F7/Aに再度感染させ、7 .5μg/mLのTrypsinのみを含み血清を含まないMEMを用い32℃で3~5日間培養し た (P3)。回収した培養上清に終濃度1%になるようにBSAを添加し-80℃にて保存 した。保存ウィルス液を解凍し、その後の実験に供した。

この方法で調製した各ウィルス溶液のタイターはSeV18+/ Δ F-GFP、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFP、SeV18+SEAP/ Δ F-GFP及びSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFPでそれぞれ、3 \times 10 8 、 $7\times$ 10 7 、 $1.8\times$ 10 8 及び8.9 \times 10 7 GFP-CIU/mL(GFP-CIUの定義はW000/70070 に記載)であった。なお、GFPを搭載したベクターについては、GFPの蛍光で直接的にカウントして定量したCIUがGFP-CIUと定義される。GFP-CIUは、CIUと実質的に同じ値を示すことが確認されている(W000/70070)。これらのタイターを測定

する際、SeV18+/△F-GFP及びSeV18+/MtsHNts △F-GFPについて、F蛋白を持続発現する細胞(LLC-MK2/F7/A)に感染後のプラークの広がりを32℃及び37℃で観察した。感染6日後の写真を図3に示したが、SeV18+/MtsHNts △F-GFPは32℃ではある程度プラークの広がりがあるものの37℃では激減しており、ビリオン形成の減少が示唆された。

[実施例3] ウィルス再構成における培養温度(32℃)の効果

実施例2で示した温度感受性導入ウィルスの再構成実験において、P1以降の温度を32℃で行った。これは温度感受性変異を導入するにあたって変異の参考にしたウィルスが32℃での生育が良い(Kondo, T. et al., J. Biol. Chem. 268: 219 24-21930(1993), Thompson, S.D. et al., Virology 160: 1-8(1987))ことから試みたものであるが、当該実験条件を詳細に観察することで、SeV再構成にあたっては(温度感受性変異導入ウィルス以外でも)、P1以降で32℃で行うことで再構成効率が上昇し、従来取れ難かったものでも回収できるようになる可能性が高いことが明らかになった。

32℃でウィルス再構成効率が上昇する理由として2点考えられる。まず、ワクシニアウィルスの増幅を抑制する為に添加しているAraCによる細胞毒性が、32℃での培養の方が抑制されていると考えられる点である。再構成時の条件である、40μg/mLの AraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用いてLLC-MK2/F7/Aを培養した場合、37℃では3-4日後で既に細胞障害が惹起され剥がれた細胞が増えてくるのに対し、32℃で培養した場合は7-10日は十分に培養継続が可能であり細胞が維持されている。転写複製効率の良くない或いは感染性ビリオン形成効率の良くないSeVを再構成する場合、培養継続期間は再構成の可否に直接反映されると考えられる。2点目は32℃で培養した場合にはLLC-MK2/F7/AにおけるF蛋白の発現が維持されている点である。F蛋白を持続発現する細胞(LLC-MK2/F7/A)を6wellプレートに10%FBSを含むMEMでコンフルエントになるまで37℃で培養し、7.5μg/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMに置換し32℃或いは37℃で培養し、

経時的にセルスクレーパーで細胞を回収した後、抗F抗体(マウスモノクローナル)を利用したWestern-blottingを行うことで、細胞内のF蛋白質を半定量的に解析した。37℃では2日間は発現が維持されているもののそれ以降は減少していたが、32℃では少なくとも8日間はF蛋白の発現が維持されていた(図4)。この点からも32℃での再構成(P1以降)の有効性が確認された。

上記Western-blottingは以下の方法で行った。6 wellプレートの1wellから回収した細胞を-80℃で凍結保存後、1xに希釈したSDS-PAGE用サンプルバッファー(Red Loading Buffer Pack; New England Biolabs, Beverly, MA) 100μLで溶解し、98℃で10分間加熱した。遠心後、上清10μLをSDS-PAGEゲル(マルチゲル10/20; Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd, Tokyo, Japan)にロードした。15mMで2.5時間 泳動後、PVDF膜(Immobilon PVDF transfer membrane; Millipore, Bedford, MA)にセミドライ法にて100mAで1時間転写した。転写膜をプロッキング溶液(Block Ace; Snow Brand Milk Products Co., Ltd, Sapporo, Japan)で4℃1時間以上 放置した後、10% Block Aceを含み抗F抗体を1/1000容量添加した一次抗体溶液に浸し、4℃で一晩放置した。0.05% Tween20を含むTBS(TBST)で3回、更にTBSで3回洗浄した後、10% Block Aceを含みHRPを結合した抗マウスIgG+IgM抗体(Goat F(ab')2 Anti-Mouse IgG+IgM, HRP; BioSource Int., Camarillo, CA)を1/5000容量添加した二次抗体溶液に浸し、室温で1時間振盪した。TBSTで3回、TBSで3回洗浄した後、化学発光法(ECL western blotting detection reagents; Amersham pharmacia biotech, Uppsala, Sweden)により検出した。

[実施例4] 温度感受性変異導入ウィルスの2次放出粒子定量 (HA assay, Wes tern-Blotting)

SeV18+/ Δ F-GFP、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPと共に、全てのウィルス蛋白を有する自律複製型でNotI部位にGFP遺伝子とその下流に終止シグナル-介在配列-開始シグナルを有するGFP断片(780bp)を搭載したSeV(SeV18+GFP:図2)を用いて比較を行った。

6 well plateにおいてコンフルエントに増殖させたLLC-MK2細胞に、 3×10^7 CIU / \square の各ウィルス溶液を1wellあたり $100\,\mu$ Lを添加して (m.o.i.3) 1時間感染し、MEMで洗浄後、1wellあたり1mLの血清を含まないMEMを添加して32°C、37°C及び38°Cの各温度で培養した。1日毎にサンプリングし、サンプリング後直ぐに血清を含まない新しいMEM1mLを添加して経時的に培養・サンプリングを行った。感染3日後に蛍光顕微鏡下でGFP発現の観察を行った所3種のウィルス共に、また32°C、37°C及び38°Cの全ての条件において、ほぼ同程度に感染し、また類似したGFPの発現があると予想された(図5)。

2次放出粒子は赤血球凝集活性(HA活性)で定量し、Katoらの方法(Kato, A. et al., Genes Cell 1, 569–579(1996))に倣って行った。即ち、丸底の96穴プレートを使用し、ウィルス液を段階的にPBSで希釈し各well 50μ Lの2倍希釈系列を作製した。その 50μ Lに1%濃度にPBSで希釈したニワトリ保存血(コスモバイオ, Tokyo, Japan) 50μ Lを混合し、4℃で1時間放置し赤血球の凝集を観察し、凝集したもののうち最もウィルス希釈率の高いものの希釈率をHA活性として判定した。また、1HAUを 1×10^6 ウィルスと換算して、ウィルス数で表した(図 6)。SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPで 2次放出粒子がかなり減少し、37℃でSeV18+/ Δ F-GFPの約1/10に減少していると判断された。また、 Δ F-GFPは、 Δ F-GFPは、 Δ F-GFPのか1/10に減少していると判断された。また、 Δ F-GFPは、 Δ F-GFPは、 Δ F-GFPのが1/10に減少しているが、少ないながらもある程度は粒子がでるので、生産が可能になっていると考えられた。

別の観点からの2次放出粒子の定量として、Western-Blottingによる定量を行った。上記と同じようにLLC-MK2細胞にm.o.i.3で感染後、感染2日後に培養上清と細胞を回収し、培養上清は48,000gで45分間遠心しウィルス蛋白を回収した。SDS-PAGE後、Western-Blottingを行い、抗M抗体で検出した。抗M抗体は新たに調製したポリクローナル抗体であり、SeV-M蛋白質の1-13(MADIYRFPKFSYE+Cys/配列番号:21),23-35(LRTGPDKKAIPH+Cys/配列番号:22)及び336-348(Cys+NVVAKNIGRIRKL/配列番号:23)の合成ペプチドを3種混合して免疫したウサギ

血清から調製したものである。Western-Blottingは実施例3に記載の方法で行い、一次抗体の抗M抗体は1/4000希釈、二次抗体のHRPを結合した抗ラビットIgG抗体 (Anti-rabbit IgG (Goat) H+L conj.; ICN P., Aurola, OH) は1/5000容量に希 釈したものを使用した。SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPでは、細胞中にはM蛋白が同程度 に多く発現しているのに対しvirusの蛋白量が減少しており(図7)、Western-Blottingの手法によっても、当該ウィルスに於いて2次放出粒子が減少していることが確認された。

[実施例 5] 温度感受性変異導入ウィルスの搭載遺伝子発現量(SEAP assay) SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPにおいて 2次放出粒子が減少しているが、それと同時に 搭載遺伝子の発現量が減少していては遺伝子発現ベクターとしては意味のない改変になってしまうので、その発現量について検証を行った。SeV18+SEAP/ Δ F-GFP 及びSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFPをLLC-MK2細胞にm.o.i.3で感染後、経時的に(感染 12, 18, 24, 50, 120時間後)培養上清を回収し、上清中のSEAP活性をReporte r Assay Kit-SEAP (TOYOBO, Osaka, Japan)を利用してKitに記載の方法に従って行った。SEAP活性は両者間での差が殆どなかった(図 8)。また同サンプルについて赤血球凝集活性(HA活性)を測定したが、HA活性はSeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-G FPでやはり約1/10に減少していた(図 9)。また、同サンプルのウィルスを48,00のgで45分間遠心しウィルス蛋白を回収した後、Western-Blottingで抗州抗体を利用して半定量的に解析した。この場合も、上清中のウィルス蛋白の減少が確認された(図 1 0)。温度感受性変異の導入によって、搭載遺伝子の発現量を殆ど減少することなく、2次放出粒子を約1/10に減少できたと判断された。

[実施例6] 温度感受性変異導入ウィルスの細胞障害性 (LDH assay)

SeV感染によって細胞が障害を受ける場合も多い。この点に関して、変異導入による影響を調べた。LLC-MK2, BEAS-2B及びCV-1細胞をそれぞれ 2.5×10^4 cells/we l1 ($100\,\mu$ L/well) で96well plateに播き培養した。培養にはLLC-MK2及びCV-1には10% FBSを含むMEMを、BEAS-2Bには10% FBSを含むD-MEM及びRPMI(Gibco-BRL,R

ockville, MD) の 1: 1 混合液を使用した。24時間培養後、1% BSAを含むMEMで希釈したSeV18+/ Δ F-GFP或いはSeV18+/MtsHNts Δ F-GFP溶液を $5\,\mu$ L/wellで添加し感染させ、6時間後ウィルス液を含む培地を除き、10% FBSを含む或いは含まない各培地に置き換えた。FBSを含まない培地の場合は感染 3 日後に、FBSを含む培地の場合は感染 6 日後に培養上清をサンプリングし、Cytotoxicity Detection Kit(Roche, Basel, Switzerland)を利用してKitに記載の方法に従って細胞障害性の定量を行った。LLC-MK2では両者ともに細胞障害は観察されなかった。またCV-1及びBEAS-2Bにおいては、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPの細胞障害性はSeV18+/ Δ F-GFPと同等以下であると判断された(図 1 1)。即ち、温度感受性変異導入での 2 次放出粒子の抑制による細胞障害性の惹起はないと結論した。

[実施例7] 2次放出粒子抑制メカニズムの検討

温度感受性変異導入によって 2 次粒子抑制が可能となったメカニズムの一端を調べる為に、M蛋白の細胞内局在について調べた。各SeV(SeV18+GFP,SeV18+/ΔF-GFP)をLLC-MK2細胞にそれぞれ感染し、32℃、37℃或いは38℃で培養し2日後に抗M抗体を利用して免疫染色を行った。免疫染色は以下の方法で行った。培養細胞をPBSで1回洗浄した後、-20℃に冷却したメタノールを添加し4℃で15分間固定した。PBSで3回洗浄後、2% Goat Serum及び0.1% Tritonを含むPBS溶液で室温1時間Blockingを行った。再度PBSで3回洗浄後、2% Goat Serumを含む一次抗体溶液(10μg/mL抗M抗体)で37℃30分間反応した。PBSで3回洗浄後、2% Goat Serumを含む一次抗体溶液(10μg/mL抗M抗体)で37℃30分間反応した。PBSで3回洗浄後、2% Goat Serumを含む一次抗体溶液(10μg/mL Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(H+L) conjugate: Molecular Plobes, Eugene, OR)で37℃15分間反応した。最後にPBSで3回洗浄後、蛍光顕微鏡下で観察した。自律複製型でF,HN両蛋白を有するSeV18+GFPでは、検討した何れの温度においても細胞表面でのM蛋白の濃縮像が観察された(図12)。このようなM蛋白の濃縮像に関しては既に報告されており(Yoshida,T. et al., Virology 71: 143-161(1976))、ビリオン形成の場所を反映していると考えられている。即ちSeV18+GFPにおいては、何れの温度に

おいてもM蛋白の細胞表面への局在が正常であり、十分量のビリオンが形成していることを示していると考えられる。一方SeV18+/ Δ F-GFPでは、38℃においてM蛋白の濃縮像が極端に減少した。M蛋白はF及びHN蛋白のそれぞれのCytoplasmic tailに結合して、細胞表面へ局在すると考えられており(Sanderson, C.M. et al., J. Virology 68: 69-76 (1994)、Ali, A. et al., Virology 276: 289-303 (2000))、SeV18+/ Δ F-GFPではその一方のF蛋白を欠失している為、M蛋白の局在に影響していると考えられる。また、SeV18+/MtsHNts Δ F-GFPではその影響が強く出て、37℃でさえM蛋白の局在に支障が出て、結果的に 2次放出粒子減少に繋がったものと予想された。

[実施例8] 2次放出粒子抑制メカニズムの検討(2)

細胞内におけるSeV蛋白の細胞内局在をより詳細に調べるために、共焦点レーザ 一顕微鏡(MRC1024; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA)による解析を 実施した。SeV18+SEAP/ΔF-GFP及びSeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFPをA-10細胞(rat myoblast) にそれぞれ感染し (m.o.i. 1) 、32℃或いは37℃で10%血清を含むMEM で培養し、1日後及び2日後に抗M抗体及び抗HN抗体を利用して免疫染色を行った。 免疫染色は以下の方法で行った。培養感染細胞をPBSで1回洗浄した後、-20℃に冷 却したメタノールを添加し4℃で15分間固定した。PBSで3回洗浄後、2% Goat Seru m, 1% BSA及び0.1% Tritonを含むPBS溶液で室温1時間ブロッキングを行った。2% Goat Serumを含むMの一次抗体溶液(10 μg/mL 抗M抗体)で37℃30分間反応し、更 にHNの一次抗体溶液(1 µ g/mL 抗HN抗体(IL4-1))で37℃30分間反応した。PBSで 3回洗浄後、2% Goat Serumを含む二次抗体溶液(10μg/mL Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG(H+L) conjugate 及び 10 μ g/mL Alexa Fluor 488 goat anti-m ouse IgG(H+L) conjugate: Molecular Plobes, Eugene, OR) で37℃15分間反応し た。PBSで3回洗浄後、核を染色するために1/4000に希釈したTO_PR03 (Molecular Plobes, Eugene, OR) を添加後室温で15分間放置し、最後に消光を抑えるために 、Slow Fade Antifade Kit (Molecular Plobes, Eugene, OR) の溶液に置換し、

共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。感染1日後の結果を図13に示したが、赤色がM蛋白、緑色がHN蛋白の局在を示し、共存している場合には黄色に表される。また遠赤色を色変換しているので青色が核である。SeV18+SEAP/ΔF-GFPの場合は、32℃、37℃何れの温度においても各蛋白の局在に大きな違いはなく、細胞表面へのM蛋白及びHN蛋白の局在が観察されている。一方SeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFPの場合は、両温度ともに各蛋白質の局在にSeV18+SEAP/ΔF-GFPの場合は、両温度ともに各蛋白質の局在にSeV18+SEAP/ΔF-GFPの場合と比べ違いがあり、細胞表面でのM蛋白の局在がほとんどない。特に37℃の場合は、M蛋白とHN蛋白がほぼ完全に分離し、M蛋白は微小管(microtubule)の中心体付近(すなわちゴルジ体付近)とも予想される部分に局在して存在している。感染後2日間培養した場合も同様の結果が得られており、特にSeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFP感染細胞においては、M蛋白の細胞内局在に感染1日後と変化がなく(図14)、それぞれの位置で移動が止まっているように見える。この結果によっても、温度感受性変異導入ウイルスで二次放出粒子が減少しているのは、粒子形成の中心的な役割を担っていると考えられているM蛋白の局在不全であると断定された。

また、SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP感染後32℃で培養した場合、M蛋白が微小管の形態に近い形で染色されている(図13)。実際に微小管の関与を証明するために、微小管の脱重合を促進する薬剤を添加し、M蛋白(及びHN蛋白)の局在の変化を調べた。SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFPをA-10にm.o.i. 1 で感染後、直後に脱重合試薬であるcolchicine(Nakarai Tesque、Kyoto、Japan)或いは colcemide(Nakarai Tesque、Kyoto、Japan)或いは colcemide(Nakarai Tesque、Kyoto、Japan)を終濃度 1μM 添加し、32℃で培養した。感染2日後に上述と同じ方法で、M蛋白、HN蛋白の細胞内局在を観察した。脱重合試薬を添加しない場合は、M蛋白は微小管様形態に似た分布を示した(図13)のに対し、脱重合試薬を添加することで、その構造が壊れ、大きな繊維状構造体として検出された(図15)。この構造は、M蛋白そのもが凝集したものか或いは脱重合した微小管の残骸にM蛋白が結合している可能性があるが、何れにしても図13に見られる、SeV18+SEAP/MtsHNts Δ F-GFP感染後32℃で培養した場合のM蛋白は、

微小管に沿って局在している可能性が高いと判断された。

上記の微小管へのM蛋白の局在が温度感受性ウィルスの特有のものか否かを調べるために、SeV18+/ΔF-GFP及びSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPの両ウィルスについて、感染後のM蛋白(及びHN蛋白)の局在変化に対する微小管脱重合試薬(colchicine)の影響を調べた。SeV18+/ΔF-GFP或いはSeV18+/MtsHNts ΔF-GFPをA-10にm.o.i. 1で感染後、直後に脱重合試薬であるcolchicineを終濃度 1μM 添加し、32℃或いは37℃で培養した。感染2日後に上述と同じ方法で、M蛋白(及びHN蛋白)の細胞内局在を観察した。結果を図16に示すが、両ウィルス感染細胞共に類似の現象を示した。即ち、感染後32℃で培養した場合は図15と同様に大きな繊維状構造体として観察された。SeV18+/ΔF-GFPの場合もM蛋白は微小管と共存している可能性が示唆された。更に、37℃においては特にSeV18+/MtsHNts ΔF-GFP感染細胞において、ゴルジ体付近と予想される部位に局在して観察された。

以上の結果から、以下のことが推察される。M蛋白はゴルジ体付近で合成され、主にF及びHN蛋白のそれぞれのCytoplasmic tailに結合した状態(Sanderson, C.M. et al., J. Virology 68: 69-76 (1994)、Ali, A. et al., Virology 276: 28 9-303 (2000))で微小管に沿って(例えばキネシンのようなモーター蛋白に結合して)細胞内を移動し、細胞表面へ局在し粒子形成が達成される。温度感受性変異を導入したウィルスにおいては、32℃においては微小管に沿った細胞内移動までは正常であるが、微小管から細胞表面へ局在する段階で不具合が生じ、微小管に沿っての局在が観察されていると考えることができる。37℃においては微小管に沿った細胞内移動さえ不具合が生じ、ゴルジ体付近で局在が観察されていると捉えることができる。M蛋白質の合成の場としては、ゴルジ体付近と予想されるが、凝集が観察されるのがその付近ということであって、合成の場そのものは別である可能性がある。但し、過去の報告例によると、微小管のコンポーネントであるtubulinはSeVの転写・複製活性に関与し、転写・複製を促進することが報告されており(Moyer, S.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5405-5409

(1986); Ogino, T. et all. J. Biol. Chem. 274, 35999-36008 (1999))、またゴルジ体は、そのtubulinが多く存在すると予想される中心体付近に局在することから微小管の中心体付近(すなわちゴルジ体付近)で合成されると予想できる。更に、SeVの変異株であるF1-R strainはM遺伝子に変異を有しているが、感染後微小管を変化させて、F1-R strainの細胞の極性に依存しない粒子形成を可能にしていると考えられている (Tashiro, M. et al., J. Virol. 67, 5902-5910 (1993))。即ち、tubulinに沿ったM蛋白の細胞内移動を想定することで、本実施例の結果も説明できる。このように予想されるメカニズムにおいて、M及びHN遺伝子へ当該温度感受性変異を導入することで、M蛋白の細胞内局在の不具合を生じ、結果的に二次放出粒子の減少が達成されていると判断された。

[実施例9] EGFP遺伝子を有するM欠失型SeVゲノムcDNAの構築

cDNAの構築にはM遺伝子を欠失したM欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA(p SeV18+/ΔM: W000/09700)を利用した。構築のスキームを図17に表した。pSeV 18+/ΔMのM欠失部位を含むBstEII断片(2098bp)を、予めSalI/XhoIで消化後ライゲーションしてEcoRV認識部位を欠失させたpSE280(Invitrogen, Groningen, Net herlands)のBstEIIサイトにサブクローニングした(pSE-BstEIIfrgの構築)。GF P遺伝子を有するpEGFP(TOYOBO, Osaka, Japan)をAcc65I及びEcoRIで消化しDNA blunting Kit(Takara, Kyoto, Japan)での5'末端のfill inにより末端の平滑化を行い、EcoRVで消化後BAP(TOYOBO, Osaka, Japan)処理を行ったpSE-BstEIIfrg にサブクローニングした。このEGFP遺伝子を含むBstEIIフラグメントをもとのpSe V18+/ΔMに戻し、M欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したM欠失型SeVゲノムcDNA(pSeV 18+/ΔMに戻し、M欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したM欠失型SeVゲノムcDNA(pSeV 18+/ΔM-GFP)を構築した。

[実施例10] M欠失複製能欠失型SeVゲノムcDNAの構築

MおよびF遺伝子の両方を欠失するSeVゲノムcDNAを構築した。下記記載の構築のスキームを図18に表した。F欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したF欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+/ΔF-GFP: Li, H.-O. et al., J. Virology 74

, 6564-6569 (2000), W000/70070) のNaeI断片 (4922bp) をpBluescript II (Str atagene, La Jolla, CA) のEcoRVサイトにサブクローニングして構築したpBlueNa eIfrg-ΔFGFPを用いてM遺伝子の欠失を行った。M遺伝子直後のApaLIサイトを利用 してM遺伝子を切り出すようにデザインした。即ち、切り出すfragmentが6nとなる ようにP遺伝子直後にApaLI認識配列を導入した。'変異導入はQuikChange' Site-Di rected Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) を利用してKitに記載の方 法に従って行った。変異導入に使用した合成オリゴの配列は5'- agagtcactgaccaa ctagatcgtgcacgaggcatcctaccatcctca-3'/配列番号: 24, 5'- tgaggatggtaggat gcctcgtgcacgatctagttggtcagtgactct-3'/配列番号:25)である。変異導入後 、ApaLIで部分消化し(37℃,5分)、QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Bothell, WA) で回収した後そのままライゲーションを行った。再度、QIAquick P CR Purification KitでDNAを回収し、BsmI及びStuIで消化後DH5 a へ形質転換して M遺伝子 (及びF遺伝子) を欠失したDNA (pBlueNaeIfrg-ΔMΔFGFP) を調製した。 M (及びF遺伝子) を欠失したpBlueNaeIfrg-ΔMΔFGFPをSalI及びApaLIで消化を 行い、M欠失部位を含むフラグメント (1480bp) を回収した。一方でpSeV18+/ΔF-GFPをApaLI/NheIで消化してHN遺伝子を含む断片(6287bp)を回収し、この2種の 断片をLitmus38 (New England Biolabs, Beverly, MA) のSall/NheIサイトにサブ クローニングした (LitmusSalI/NheIfrg-ΔMΔFGFPの構築)。LitmusSalI/NheIfr g-ΔMΔFGFPをSall/Nhelで消化して回収したフラグメント(7767bp)と、またpSe V18+/ΔF-GFPをSalI/NheIで消化して回収したM及びHN等遺伝子を含まないフラグ メント (8294bp) をライゲーションして、M及びF遺伝子を欠失しその欠失部位にE GFP遺伝子を搭載したM及びF欠失型センダイウィルス全長ゲノムcDNA (pSeV18+/Δ MΔF-GFP) を構築した。構築したM欠失型(及びM及びF欠失型)ウィルスの構造を 図19に表した。このゲノムcDNAは、所望の改変F蛋白質を含むM及びF欠失型SeV

[実施例11] SeV-M蛋白を発現するヘルパー細胞の作製

の作製に有用である。

M蛋白を発現するヘルパー細胞作製の為にCre/loxP発現誘導システムを利用した。当該システム構築のため、F蛋白のヘルパー細胞(LLC-MK2/F7細胞)作製(Li, H.-O. et al., J. Virology 74, 6564-6569 (2000), W000/70070) において採用したCre DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988))を利用した。

〈1〉M発現プラスミドの構築

M蛋白を発現誘導するヘルパー細胞の作出の為に、既に作製している上記LLC-MK 2/F7細胞を利用し、この細胞に同システムでのM遺伝子導入を行うこととした。但 し、F遺伝子導入時に使用したpCALNdLw/Fはneomycin耐性遺伝子を有している為、 同細胞を利用する為には別の耐性遺伝子の導入が必須であり、まず図20に記載 のスキームでM遺伝子搭載プラスミド (pCALNdLw/M:pCALNdLwのSwaIサイトにM遺 伝子導入) のneomycin耐性遺伝子をhygromycin耐性遺伝子に置き換えた。即ち、p CALNdLw/MをHincII及びEcoT22Iで消化しM遺伝子を含む断片(4737bp)をアガロー ス電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System で回収した。同時に、同pCALNdLw/MをXhoIで切断、neomycin耐性遺伝子を含まな い断片 (5941bp) を回収後、更にHincIIで切断し1779bpの断片を回収した。Hygro mycin耐性遺伝子はpcDNA3.1hygro(+) (Invitrogen, Groningen, Netherlands) を テンプレートにhygro-5' (5'-tctcgagtcgctcggtacgatgaaaaagcctgaactcaccgcgacg tctgtcgag-3'/配列番号:26)及びhygro-3'(5'-aatgcatgatcagtaaattacaatga acatcgaaccccagagtcccgcctattcctttgccctcggacgagtgctgggggggtc-3'/配列番号: 27) の2種のプライマーを用いてPCRを行い、QIAquick PCR Purification Kit で回収した後XhoI及びEcoT22Iで消化して調製した。これら3種の断片をライゲー ションしpCALNdLw-hygroMを作製した。

〈2〉SeV-M及びF蛋白を誘導発現するヘルパー細胞のクローニング トランスフェクションにはSuperfect Transfection Reagentを用いプロトコー ルに記載の方法で行った。即ち以下の方法をとった。LLC-MK2/F7細胞を 5×10^5 ce 11s/dishで60mmシャーレに播き、10% FBSを含むD-MEMで24時間培養した。pCALNdL w-hygroMの 5μ gをFBS及び抗生物質を含まないD-MEMに希釈し(総量で 150μ L)、撹拌後Superfect Transfection Reagent 30μ Lを添加、再度撹拌し室温で10分間 放置した。放置後、10%FBSを含むD-MEMを1加L添加し撹拌後、PBSで 1 回洗浄したLL C-MK2/F7細胞へこのトランスフェクション混合液を添加した。 37° C,5% CO $_2$ インキュベーターで 3 時間培養後、トランスフェクション混合液を除去し、PBSで 3 回洗浄、10% FBSを含むD-MEMを5加L添加し24時間培養した。培養後、トリプシンで細胞を剥がし、96wellプレートに約5cells/wellの割り合いで希釈し、 150μ g/mLのhygromycin(Gibco-BRL,Rockville,MD)を含む10% FBS入りのD-MEMで約 2 週間培養した。単一の細胞から広がったクローンを6wellプレートまで拡大培養した。このようにして調製した合計130クローンについて以下解析を行った。

〈3〉SeV-M及びF蛋白を誘導発現するヘルパー細胞クローンの解析

得られた130種のクローンについて、M蛋白の発現量をWestern-blottingで半定量的に解析した。各クローンを6wellプレートに播き、ほぼコンフルエントの状態で、5% FBSを含むMEMで希釈したCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウィルス(AxCANCre)をSaitoらの方法(Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998))でm. o. i. 5で感染させた。32℃で2日間培養後、培養上清を除去しPBS で1回洗浄し、セルスクレーパーで細胞を剥がして細胞を回収した。11aneあたりこの1/10量をアプライしてSDS-PAGEを行った後、抗M抗体を利用して実施例3及び4に記載の方法でWestern-blottingを行った。130クローンの中で比較的M蛋白の発現量の多かったものに関して、抗F抗体(f236: Segawa, H. et al., J. Biochem. 123, 10 64-1072 (1998))を利用したWestern-blottingの結果と併せて図21に記載した

実施例11でクローニングしたSeV-M蛋白を誘導発現するヘルパー細胞を用いて M欠失型SeV (SeV18+/ Δ M-GFP) のウィルス再構成を実施し、これらの細胞クロー ンのウイルス産生能を評価した。SeV18+/ΔM-GFPのPO lysateを各クローンに添加 し、GFP蛋白の広がりが観測されるか(M蛋白のトランス供給が達成されるか)否 かについて検証した。PO lysateの調製は以下のように行った。LLC-MK2細胞を 5 ×10⁶ cells/dishで100mmのシャーレに播き、24時間培養後、PLWUV-VacT7を室温 で1時間感染させた(m.o.i.2)。細胞を血清を含まないMEMで洗浄した後、プラ スミドpSeV18+/ΔM-GFP, pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L, pGEM/F-HN及びpGEM/Mをそれ ぞれ 12μ g, 4μ g, 2μ g, 4μ g, 4μ g及び 4μ g/dishの量比で0pti-MEMに懸濁し、 1μg DNA/5μL相当のSuperFect transfection reagentを入れて混合し、室温で1 5分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養し た。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40μg/mLのAraC及び7.5μg/mL のTrypsinを含むMEMで培養した。24時間培養後、8.5×106 cells/dishあたりにL LC-MK2/F7/Aを重層し、40μg/mLの AraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで更に 2日間37℃で培養した (P0)。これらの細胞を回収し、ペレットを2mL/dishあた りの Opti-MEMに懸濁、凍結融解を3回繰り返えしてPO lysateを調製した。一方 で10種のクローンを24 wellプレートに播き、ほぼコンフルエントの時にAxCANCre をm.o.i. 5で感染し、感染後32℃で2日間培養した細胞を準備した。この細胞にS eV18+/ΔM-GFPのPO lysateを各200 μL/wellでトランスフェクションし、40 μg/mL の AraC及び7.5 µ g/mLのTrypsinを含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養した 。#18及び#62のクローンでSeV18+/ΔM-GFPによるGFP蛋白の広がりが観察された(図22)。特に、#62の方で広がりが早く、以下の実験にはこの#62を使用した。 当該細胞についてAxCANCre誘導前のものをLLC-MK2/F7/M62と記載し、誘導後のも のでF及びM蛋白を持続発現しているものをLLC-MK2/F7/M62/Aと記載することにす る。LLC-MK2/F7/M62/Aを利用してSeV18+/ΔM-GFPの調製を継続し、P2の感染 6 日 後に9.5×10⁷, P4の感染5日後に3.7×10⁷ GFP-CIUのウィルスを調製した。

本実験において、実施例3に示すように、P1以降を32℃などの低温で培養することがSeV18+/ΔM-GFPのウィルス回収にとって非常に重要と考えられた。SeV18+/ΔM-GFPにおいてM蛋白を発現細胞(LLC-MK2/F7/M62/A)からトランスに供給していることが原因と考えられるが、感染の広がりが非常に遅くP1の感染7日後でようやく広がりが見られた(図22)。即ち、当該ウィルスの再構成実験においても、「P1以降を32℃で培養する」ことが転写複製効率の良くない或いは感染性ビリオン形成効率の良くないSeVを再構成する場合に非常に有効であることを支持している。

[実施例13] SeV-M蛋白を誘導発現するヘルパー細胞を用いたウイルス生産条件の検討

上記のウィルスの生産性の面での検討も行った。LLC-MK2/F7/M62/Aを6well pla teに播き37℃で培養した。ほぼコンフルエントの状態で32℃に移行させ、1日後にSeV18+/ΔM-GFPをm.o.i. 0.5で感染し、経時的に培養上清を回収し新たな培地を添加した。回収した上清についてCIUとHAUを求めた。感染4~6日後で最も多くのウィルスが回収された(図23)。HAUは感染6日後以降も維持されているが、この時点では細胞障害性が強く出ており、ウィルスパーティクル由来では無く、細胞断片に結合している或いは遊離しているHA蛋白による活性が出ているものと予想された。即ち、ウィルスを回収するには感染5日後までの培養上清を回収することが好ましいと考えられる。

[実施例14] M欠失型SeVのウィルスの構造確認

SeV18+/ΔM-GFPのウィルス遺伝子をRT-PCRで、ウィルス蛋白をWestern-blottin gで確認した。RT-PCRはP2の感染6日後のウィルスを利用した。ウィルス溶液からのRNAの回収はQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Bothell, WA) を利用し、またcDNA調製はThermoscript RT-PCR System (Gibco-BRL, Rockville, MD) を利用して、両システムともに添付のプロトコールに記載の方法で行った。cDNA調製時のプライマーにはキットに添付のrandom hexamerを使用した。また、RNAからの産

物であることの確認として、reverse transcriptaseの有無で同反応を行った。調製したcDNAをテンプレートとしてP遺伝子上のF3593(5'- ccaatctaccatcagcatcag c-3'/配列番号:28)とF遺伝子上のR4993(5'- ttcccttcatcgactatgacc-3'/配列番号:29)の組み合わせと、同じくP遺伝子上のF3208(5'- agagaacaagact aaggctacc-3'/配列番号:30)とR4993の組み合わせの2種でPCRを行った。SeV 18+/ΔM-GPPの遺伝子構造から予想されたように、前者及び後者からそれぞれ1073 bp及び1458bpの増幅が観察された(図24)。reverse transcriptase無し(RT-)の場合は当該遺伝子の増幅はなく、またGFP遺伝子ではなくM遺伝子が挿入している場合(pSeV18+GFP)はそれぞれ1400bp及び1785bpなので明らかに大きさが異なり、本ウィルスはM欠失型の遺伝子構造であることを支持した。

Western-blottingにより蛋白側からの確認を行った。SeV18+/ Δ M-GFP (図中 Δ M), SeV18+/ Δ F-GFP (図中 Δ F) 及びSeV18+GFP (図中 18+) をm.o.i.3でLLC-MK 2に感染し、感染3日後に培養上清と細胞を回収し、培養上清は48,000gで45分間遠心しウィルス蛋白を回収した。SDS-PAGE後、Western-Blottingを行い、抗M抗体、抗F抗体及び主にNP蛋白を認識するDN-1抗体(ラビットポリクローナル)で検出した。実施例3及び実施例4に記載の方法で行った。SeV18+/ Δ M-GFP感染細胞ではM蛋白が観測されずF或いはNPは観測されたことから、蛋白側からもSeV18+/ Δ M-GFPの構造であることが確認された(図25)。この時、SeV18+/ Δ F-GFP感染細胞ではF蛋白が観測されず、SeV18+GFPでは調べた全てのウィルス蛋白質が観測された。また、培養上清のウィルス蛋白に関しては、SeV18+/ Δ M-GFPにおいてはNPの観測量が非常に少なく、二次放出粒子が無いか或いは非常に少ないと予想された

[実施例 1 5] M欠失型SeVの 2 次放出粒子の有無に関する定量的解析 実施例 1 4 記載のようにSeV18+/ΔM-GFPをm. o. i. 3でLLC-MK2に感染し、感染 3 日後に培養上清を回収し、0. 45 μ m径のフィルターを通した後48,000gで45分間遠心し、回収したウィルス蛋白を用いてWestern-blottingを行い、半定量的に培養

上清中のウィルス蛋白を検出した。対照としてSeV18+/ Δ F-GFPを同様に感染して調製したサンプルを使用した。それぞれの希釈系列を作製しWestern-blottingを行いDN-1抗体(主にNP蛋白認識)で検出した。SeV18+/ Δ M-GFP感染細胞上清中のウィルス蛋白はSeV18+/ Δ F-GFP感染細胞のものの約1/100であると判断された(図26)。また、同サンプルのHA活性はSeV18+/ Δ F-GFP(64 HAU)なのに対しSeV18+/ Δ M-GFP(<2 HAU)であった。

同実験を再度経時的に行った。即ち、SeV18+/ΔM-GFPをm.o.i.3でLLC-MK2に感 染し、経時的に(一日毎に)培養上清を回収し、HA活性を測定した(図27)。 感染4日後以降に少ないながらもHA活性が観測された。但し、同サンプルについ て細胞障害性の指標となるLDH活性を測定した所、SeV18+/ΔM-GFP感染細胞では感 染4日後以降明らかな細胞障害性が惹起しており(図28)、HA活性の上昇はウ ィルス様パーティクルに起因するのでは無く、細胞断片に結合している或いは遊 離しているHA蛋白による活性が出ている可能性が高いと予想された。更に、感染 5日後の培養上清について、カチオニックリポソームであるDosper Liposomal Tr ansfection Reagent (Roche, Basel, Switzerland) を用いて検証した。即ち、培 養上清100 μ L と Dosper 12.5 μ L を混合し室温で10分放置後、6 well プレートにコ ンフルエントに培養したLLC-MK2細胞にトランスフェクションした。2日後に蛍光 顕微鏡下で観察した所、二次放出粒子の存在するSeV18+/ΔF-GFP感染細胞の培養 上清では、多くのGFP陽性細胞が観察されるのに対し、SeV18+/ΔM-GFP感染細胞の 培養上清ではGFP陽性細胞は僅かには存在したが殆ど観察されなかった(図29) 。以上の結果より、M蛋白を欠失することで、二次放出粒子はほとんど抑制可能で あると結論できた。

2. プロテアーゼ依存性トロピズムを変換した、粒子形成能を低下または欠損させたSeVベクターの構築

上記で構築したM欠損SeVの再構成系を利用して、以下のようにF蛋白質の開裂部

位を改変したSeVの構築を行った。

[実施例16] F蛋白質の活性化部位を変換したM欠失型SeVゲノムcDNAの構築 FのF1/F2の開裂部位(Fの活性化部位)に癌細胞で高発現しているプロテアーゼ の認識配列を導入したM欠失型SeVゲノムcDNAを構築した。MMP-2及びMMP-9の合成 基質として利用されている配列を元にした様々な配列、及びuPAの基質を元にした配列をデザインした。図30には、MMP-2及びMMP-9の基質として利用されている 合成基質の配列(Netzel-Arnett, S. et al., Anal. Biochem. 195, 86-92(1991))を元にし、または新たに修正を加えてデザインした2種の配列[PLG↓MTS(配列番号:3)およびPLG↓LGL(配列番号:31);以下、これらの配列を有するF蛋白をそれぞれF(MMP#2)及びF(MMP#3)と表す]、MMPの合成基質に共通の3アミノ酸配列PLGのみを導入した配列(以下、同配列を有するF蛋白をF(MMP#4)と表す)及びuPAの基質VGR(配列番号:6)を元にした配列(以下、同配列を有するF蛋白をF(MMP#4)と表す

着目しているMMP (MMP-2及びMMP-9) に、より選択的に作用するように実際のデザインを行う場合、市販されている合成基質の配列とともに基質特異性を詳細に検討した報告 (Turk, B.E. et al., Nature Biotech. 19(7) 661-667 (2001); Ch en, E.I. et al., J. Biol. Chem. 277(6) 4485-4491 (2002)) を参考にすることが出来る。特にMMP-9に関しては、Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr)のP3からP2'までのコンセンサス配列 (X=全ての残基, Hy=疎水性残基)が提唱されている (Kridel, S.J. et al., J. Biol. Chem. 276(23) 20572-20578 (2001))。そこで、F(MMP#2)については、このコンセンサス配列に合致するように、元の合成基質の配列PLG↓MW Sから本デザインのPLG↓MTSに新たにデザインを行っている。

遺伝子構築のスキームを図31に示した。M欠失部位にEGFP遺伝子を搭載したM 欠失型センダイウイルス全長ゲノムcDNA(pSeV18+/ΔM-GFP)をSall及びNheIで消化し、F遺伝子を含む断片(9634 bp)をアガロース電気泳動で分離、該当するバンドを切り出し、QIAEXII Gel Extraction System (QIAGEN, Bothell, WA)で回 収し、LITMUS38 (New England Biolabs, Beverly, MA) のSalI/NheIサイトにサブ クローニングした(LitmusSalI/NheIfrg ΔM-GFPの構築)。F遺伝子への変異導入 はこのLitmusSalT/NheIfrg A M-GFP上で、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesi s Kit (Stratagene, La Jolla, CA) を利用してKitに記載の方法に従って行った 。変異導入に使用した合成オリゴの配列は、F(MMP#2)への変換のためには 5'-CTG TCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCatGaCGAGtTTCTTCGGTGCTGTGATTGGTACTATC-3 (配列番号: 3 2) および 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAaCTCGtCatGccAagAg gGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'(配列番号:33)、F(MMP#3)への変換には ${\tt 5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCCtGggGttATTCTTCGGTGCTGTGATTGGTA}$ CTATCG-3'(配列番号: 34) および 5'-CGATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAATaaCccCa GGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'(配列番号:35)、F(MMP#4)へ の変換には 5'-CAAAATGCCGGTGCTCCCCcGTtGgGATTCTTCGGTGCTGATT-3'(配列番号 :36) および 5'-AATCACAGCACCGAAGAATCcCaACgGGGGAGCACCGGCATTTTG-3'(配列 番号:37)、及び F(uPA) への変換には 5'-GACACAAAATGCCGGTGCTCCCgtGggGAGA TTCTTCGGTGCTGTGATTG-3'(配列番号:38)および 5'-CAATCACAGCACCGAAGAATCTC ccCacGGGAGCACCGGCATTTTGTGTC-3'(配列番号:39)である。小文字表記が変異 **導入塩基を示している。**

F遺伝子上に目的の変異を有するLitmusSalI/NheIfrg Δ M-GFPをSalI/NheIで消化して、F遺伝子を含むフラグメント(9634 bp)を回収した。一方で、F欠失部位に EGFP遺伝子を搭載したF欠失型センダイウイルス全長ゲノムcDNA(pSeV18+/ΔF-GF P:Li, H.-O. et al., J. Virol. 74, 6564-6569(2000),W000/70070)をSalI及 びNheIで消化しNP遺伝子を含む断片(8294bp)に、合成オリゴDNAを利用してマルチクローニングサイトを導入したプラスミド(pSeV/ΔSalINheIfrg-MCS: PCT/JPO 0/06051)を、SalI及びNheIで消化してフラグメント(8294bp)を回収した。この 両フラグメントをライゲーションし、F(MMP#2)、F(MMP#3)或いはF(MMP#4)の遺伝子 (MMPで活性化されるようにデザインしたF遺伝子)を有するM欠失型SeV cDNA

(pSeV18+/F(MMP#2) ΔM-GFP、pSeV18+/F(MMP#3) ΔM-GFP或いはpSeV18+/F(MMP#4) ΔM-GFP) 、及びF(uPA) の遺伝子 (uPAで活性化されるようにデザインしたF遺伝子) を有するM欠失型SeV cDNA (pSeV18+/F(uPA) ΔM-GFP) を構築した。

[実施例17] Fの活性化部位を変換したM欠失型SeVベクターの再構成と増幅 ウイルスの再構成はLiらの報告 (Li, H.-O. et al., J. Virol. 74: 6564-6569 (2000), W000/70070) に従って行った。M欠失型であるので、M蛋白をトランスに 供給することが可能な上記のヘルパー細胞 (実施例11)を利用した。当該ヘルパー細胞作製にはCre/loxP発現誘導システムを利用している。当該システムはCre DNA リコンビナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988))を利用したものであり、同プラスミドのトランスフォーマントにCre DNAリコンビナーゼを発現する組み換えアデノウイルス (AxCANCre)をSaitoらの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998))で感染させて挿入遺伝子を発現させた(実施例11および12参照)。

Fの活性化部位を変換したM欠失型SeVの再構成は以下のように行った。LLC-MK2 細胞を 5×10° cells/dishで100mmのシャーレに播き、24時間培養後、ソラレン(psoralen)と長波長紫外線(365nm)で20分間処理したT7ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウイルス(PLWUV-VacT7: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986))を室温で1時間感染させた(MOI 2)。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、プラスミドpSeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP(或いはpSeV18+/F(MMP#3) Δ M-GFP、pSeV18+/F(MMP#4) Δ M-GFP、または pSeV18+/F(uPA) Δ M-GFP),pGEM/NP,pGEM/P,pGEM/L(Kato, A. et al., Genes cells 1, 569-579(1996))及びpGEM/F-HN(Li, H.-O. et al., J. Virology 74. 6564-6569(2000),W000/70070)をそれぞれ12μg,4μg,2μg,4μg 及び4μg/dishの量比でOpti-MEM(Gibco-BRL,Rockville,MD)に懸濁し、1μg DNA/5μL相当のSup

erFect transfection reagent (Qiagen, Bothell, WA) を入れて混合し、室温で1 5分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養し た。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄し、40 μ g/mLの Cytosine β-D-ar abinofuranoside (AraC: Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5 μg/mLのTrypsin (Gibc o-BRL, Rockville, MD) を含むMEMで培養した。24時間培養後、8.5×106 cells/ dishあたりにM蛋白質を持続発現する細胞 (LLC-MK2/F7/M62/A) を重層し、40 μ g/ mLの AraC及び7.5μg/mLのTrypsinを含むMEMで更に2日間37℃で培養した (P0) 。これらの細胞を回収し、ペレットを2mL/dishあたりの Opti-MEMに懸濁した。 凍結融解を3回繰り換えした後、ライゼートをそのままLLC-MK2/F7/M62/Aにトラ ンスフェクションし、40 µ g/mLの AraC、7.5 µ g/mLのTrypsin及び50U/mLのcollag enase type IV (ICN, Aurola, OH) を含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養し た (P1) 。 $3\sim1$ 4日後培養上清の一部をとり、新たに調製したLLC-MK2/F7/Aに 感染させ、40 µ g/mLの AraC、7.5 µ g/mLのTrypsin及び50U/mLのcollagenase type IVを含み血清を含まないMEMを用い32℃で培養した(P2)。3~14日後に新た に調製したLLC-MK2/F7/M62/Aに再度感染させ、7.5μg/mLのTrypsin及び50U/mLのc ollagenase type IV を含み血清を含まないMEMを用い32℃で3~7日間培養した (P3)。回収した培養上清に終濃度1%になるようにBSAを添加し-80℃にて保存し た。保存ウイルス液を解凍し、その後の生産及びin vitro実験に供した。

また、M蛋白をトランスに供給するヘルパー細胞として、LLC-MK2/F7/M62に、更に同システム (pCALNdLw: Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988)) のSeV-M遺伝子 (及びSeV-F遺伝子)を導入し、細胞のクローニングを継続することで、より高いタイターでのM欠失型SeVベクターを調製可能なヘルパー細胞 (LL C-MK2/F7/M62-#33) の作出に成功した。この細胞を用いて調製した場合、F遺伝子に変異を導入していないM欠失型SeVベクター (SeV18+/ ΔM-GFP)を1×10⁸ GFP-CI U/nL (GFP-CIUの定義はW000/70070に記載)以上のタイターで調製することが可能となった。尚、同細胞を利用した場合、SeV18+/F(MMP#2) ΔM-GFP及びSeV18+/F(MP

A) Δ M-GFPの場合もともに 1×10^8 GFP-CIU/L以上のタイターでの調製が可能であった。

同様の方法で再構成を行った場合、SeV18+/F(MMP#3) ΔM-GFP及びSeV18+/F(MMP#4) ΔM-GFPについてはウィルス粒子を回収することが出来なかった。これらのものについてもウィルス粒子を回収するには、更に再構成の条件を検討しなければならないが、同じ条件で回収出来なかったことから、F(MMP#3)及びF(MMP#4)においては、F1/F2開裂部位(F蛋白の活性化部位)のデザイン上に問題があり、例えば開裂効率が悪い、或いは開裂後のF蛋白の活性が弱い等の影響が出ている可能性がある。逆に、F(MMP#2)のデザインで高タイターのウィルス粒子が回収できたことから、このデザインであれば、開裂効率が良く、開裂後のF蛋白の活性にも影響しない良いデザインであると考えられた。

[実施例18] Fの活性化部位を変換したM欠失型SeVベクターのin vivo用サンプル調製

in vivo検討用各種M欠失型SeVベクターの調製は、超遠心でウイルス粒子をpell et downする簡易精製法で行った。LLC-MK2/F7/M62-#33を6 well plateでほぼコンフルエントに増殖した後、AxCANCreをMOI 5で感染し、感染後32℃で2日間培養した。この細胞にSeV18+/F(MMP#2) ΔM-GFP或いはSeV18+/ΔM-GFPをMOI 0.5で感染し、SeV18+/F(MMP#2) ΔM-GFPの場合は7.5 μg/mLのTrypsin及び50 U/mLのcollagenas e type IVを含み血清を含まないMEM(1mL/well)で、SeV18+/ΔM-GFPの場合は7.5 μg/mLのTrypsinのみを含み血清を含まないMEM(1mL/well)中で、3日間32℃で培養した。各6well分をまとめて上清を回収後、2,190gで15分間遠心し、回収した上清を内径0.45 μmフィルターでろ過し、更に40,000gで30分間遠心した。pelletをPBS 500 μLで懸濁し精製ウイルス溶液とした。このようにして調製したM欠失型SeVベクターのタイターは、SeV18+/F(MMP#2) ΔM-GFP及びSeV18+/ΔM-GFPでそれぞれ、1.3×10°及び4.5×10°GFP-CIU/mLであった。実施例17および18で作製したウイルスはF蛋白質が開裂されており感染性を有する。このようなSeVをF開裂

型SeVまたは感染型SeVと呼ぶ。また、以下 SeV18+/ ΔM-GFP、SeV18+/F(MMP#2) Δ M-GFP、及びSeV18+/F(uPA) ΔM-GFPを、それぞれSeV/ ΔM-GFP、SeV/F(MMP#2) ΔM-GFP、SeV/F(uPA) ΔM-GFP とも略記する。

[実施例 1.9] F改変M欠失型SeVベクターのプロテアーゼ依存的感染および細胞融合型感染の評価方法

Exogenous experiment

細胞系に外からプロテアーゼを添加する感染手順をExogenous experimentと呼ぶ。以下の実施例において行った exogenous experiment の基本的な手順を示す。これと異なる条件で行った場合はそれぞれの実施例において記載した。96 well plate にLLC-MK2をconfluent (5×10⁵ cell/well) になるように培養した。MEMで2回洗浄後、SeV [F開裂型:1×10⁵ CIU/mlもしくはF非開裂型:1×10⁷ particles/ml (HA換算;実施例25参照)]含有MEMを50μ1加え、感染させた。同時に同量50μ1のプロテアーゼ含有MEMを加えた。37℃で培養した。4日後、蛍光顕微鏡にて感染のひろがりを観察した。また、1mm²の細胞あたりのGFPの発現している細胞をカウントした。プロテアーゼは、collagenase (collagenase type IV) は ICN Biomedicals Inc社、MMP2 (active MMP2), MMP3, MMP7, MMP9 (active MMP9)、およびプラスミンは、コスモバイオ社より購入して使用した。

Endogenous experiment

細胞系に外からプロテアーゼを添加せず、細胞が発現するプロテアーゼにより感染を成立させる感染手順をEndogenous experimentと呼ぶ。以下の実施例において行った endogenous experiment の基本的な手順を示す。これと異なる条件で行った場合はそれぞれの実施例において記載した。96 well plate に各癌細胞をconfluent (5×10^5 cell/well) になるように培養した。MEMで2回洗浄後、SeV [F開 裂型: 1×10^5 CIU/mlもしくはF非開裂型: 1×10^7 HAU/ml (実施例25参照)] 含有MEMを 50μ 1加え、感染させた。この時、培地には終濃度1%となるようにFBSを添加した。4日後、蛍光顕微鏡にて感染のひろがりを観察した。また、 $1mm^2$ の細

胞あたりのGFPの発現している細胞をカウントした。

[実施例20] F改変M欠失型センダイウイルスベクターによるプロテアーゼ依存的細胞融合型感染 (Exogenous experiment)

プロテアーゼをほとんど発現していないLLC-MK2細胞を用いて、Fの改変によっ てそのプロテアーゼ依存的に細胞融合型感染が成立しているかを上記のExogeneou s experimentにより確かめた(図32)。SeV/ΔM-GFP、SeV/F(MMP#2)ΔM-GFP、S eV/F(uPA) Δ M-GFP の 3 種類のM欠失型のSeV (実施例 1 7) を細胞に感染させ、同 時にそれぞれ 0.1μ g/ml の collagenase type IV (Clostridium histolyticum) , active MMP2, active MMP9, または uPA, あるいは 7.5μg/ml Trypsin を加え た。4日後、蛍光顕微鏡で観察した。Fを改変していないSeV/ΔM-GFPは、trypsin を加えたLLC-MK2でのみ、感染した細胞の周りの細胞と細胞融合をおこし、細胞融 合型感染がみられ、多核細胞であるsynthitiumを形成した(図32 L)。MMP分解 配列をF蛋白質に組み込んだSeV/F(MMP#2) AM-GFPは、collagenase, active MMP2, active MMP9を加えたLLC-MK2で細胞融合型感染がみられ、多核細胞であるsynthi tiumを形成した (図32 E, F, M)。一方、urokinase-type plasminogen activa tor (uPA) , tissue-type PA (tPA) 分解配列をF蛋白質に組み込んだSeV/F(uPA) ΔM-GFPでは、trypsin存在下で細胞融合型感染がみられ、さらにF蛋白質を改変し たことによってuPAで多核細胞であるsynthitiumを形成した(図32 Q, R)。こ れは、それぞれのプロテアーゼ分解基質配列をF蛋白質に組み込むことによって、 M欠失型SeVは、その分解基質配列依存的に細胞融合型感染をして、接している細 胞に感染が広がっていくことを示している。

[実施例21] 癌細胞株のMMP発現特異的な細胞融合型感染 (Endogenous experiment)

MMP発現癌細胞株であるHT1080 (ヒト線維芽肉腫) (Morodomi, T. et al. (1992) Biochem. J. 285 (Pt 2), 603-611), tPA発現株であるMKN28 (ヒト胃癌細胞株) (Koshikawa, N. et al. (1992) Cancer Res. 52, 5046-5053), どちらのプ

ロテアーゼも発現していない細胞株SW620 (ヒト大腸癌株)を用いて、内在性のプロテアーゼ選択的に細胞融合型感染がみられるかどうか、実施例17で作製したSeVを用いて Endogenous experimentにより実験を行った。これらの癌細胞のうち、MKN28は理化学研究所 (Cell No. RCB1000) より、また HT1080 (ATCC No. CCL-121), および SW620 (ATCC No. CCL-227), 並びに以下の実施例で使用する SW4 80 (ATCC No. CCL-228), WiDr (ATCC No. CCL-218), Panc-1 (ATCC No. CRL-1469) は、ATCC (American type culture collection) より分与されたものを用いた。培地はそれぞれ分与先で用いられている培地を用いた。この時、全ての培地に終濃度1%となるようにFBSを添加した。図33で示すように、MMP発現株HT1080ではSeV/F(MMP#2) ΔM-GFPのみ10倍以上その感染がひろがっていて、tPA発現株MKN28ではSeV/F(uPA) ΔM-GFPのみが細胞融合型感染のひろがりがみられる。どちらのプロテアーゼの発現もないSW620では全く感染のひろがりはみられない。

[実施例22] Phorbol EsterでのMMP誘導による細胞融合型感染

癌細胞はその周りに存在する増殖因子などによって生体内ではMMPが誘導されていることが報告されている。その現象はPhorbol Esterであるphorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によってin vitroで再現することが可能である。このMMP発現の誘導が再現された条件における感染を調べるために、PMAによってMMP2の活性化とMMP9の誘導が知られているPanc I (膵臓癌株)を用いて、F改変M欠失型SeVベクターの細胞融合型感染の有無を調べた (Zervos, E.E. et al. (1999) J. Surg. Res. 84, 162-167)。96 well plate に PancIおよび他の癌細胞株をconfluent (5×10⁵ cell/well) になるように培養した。実施例17で作製したSeVを用いてEndogenous experimentにより実験を行った。MEMで2回洗浄後、Moi=0.01になるように1×10⁵ CIU/mlのSeV含有 MEMを50μ1加え、感染させた。同量50μ1の40 nM phobol 12-myristate 13-acetate (Sigma)を含むMEMを加えた。この時、培地に終濃度1%となるようにFBSを添加した。

MMP2, 9の誘導発現はgelatin分解活性がある部分が白くぬけるgelatin zymogra

phy法 (Johansson, S., and Smedsrod, B. (1986) J. Biol. Chem. 261, 4363-43 66) によって確認した。具体的には、それぞれの培養の上澄みをとり、Sample bu fferで溶解した。最終濃度が1 mg/ml gelatinとなるようアクリルアミドに混合し、8% acrylamide gelを作製した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、10 mM Tris pH 8.0, 2.5% Triton X-100で洗浄した。Gelatinase活性化バッファー(50 mM Tris, 0.5 mM CaCl₂, 10⁻⁶ M ZnCl₂)で37℃1日培養後、1%クマジプルー R-25 0、5%酢酸、10%メタノールで染色した(図34上パネル)。Cが対照(control),Tが20 nM PMAによって誘導された上澄みを用いたもので、HT1080とPanc IでMMP9 が誘導されていることがわかる。Panc I で誘導前に潜在型のMMP2が検出されているがそれは潜在型でgelatin分解活性はほとんどないことが知られている。図34 (下パネル)が示すように、SeV/F(MMP#2) ΔM-GFPに感染したPanc Iは、MMP誘導によって細胞融合型感染がみられるようになることが示された。

[実施例23] In vivoにおけるHT1080細胞株感染SeV/F(MMP#2) Δ M-GFPのひろがり

HT1080の担癌ヌードマウスを作製した。BALB/c nude mouse (charles river) の右背部の皮下にヒト線維芽腫 HT1080を5×10⁶ cell (1×10⁸ cell/ml を50μl) 注入した。7~9日後に長径が3 mmを越えた個体を用いた。癌を楕円形とみなした体積は30~100 mm³ となり、そこに以下のF開裂型SeVを50μl癌部位に1度だけ注入した: MEM (対照) (N=5), SeV-GFP (1×10⁸ CIU/ml) を含むMEM (N=5), SeV / ΔM-GFP (1×10⁸ CIU/ml) を含むMEM (N=7), SeV/F (MMP#2) ΔM-GFP (1×10⁸ CIU/ml) を含むMEM (N=7)。 2日後、蛍光顕微鏡にて観察した(図35)。 SeV-GFP、SeV/ΔM-GFPは注入したまわりのみ蛍光がみられることが確認できる(図35 E,H)。それに対してSeV/F (MMP#2) ΔM-GFPでは癌全体に広がることが観察された(図35 K)。拡大したものでは、SeV-GFP、SeV/ΔM-GFPが細胞1つ1つの蛍光が確認されるのに対して、SeV/F (MMP#2) ΔM-GFPでは細胞の形がはっきりせず細胞融合していることを示唆している。また、上部から写真の像における癌全体およ

びGFPの発現の面積をNIH image によってもとめた。癌全体に対するGFP発現領域の割合は、SeV-GFPが10%、SeV/ΔM-GFPが20%であるのに対してSeV/F(MMP#2) ΔM-GFP投与では90%の感染がみられ、明らかな感染の広がりが確認された(図36)。癌以外の組織に関しては、癌細胞との境界に存在する筋膜及び皮下の結合組織に対して細胞融合型感染はほとんど観察されず、この条件では癌以外の正常組織には感染は広がらないと判断された。

[実施例24] 担癌ヌードマウスによるF改変M欠失型SeVベクターの抗腫瘍効果図35と同様にHT1080担癌マウスを作製した。8または9日後、腫瘍径が3mm以上の個体を選択し、以下の4群のF開裂型SeVを50 μ 1癌部位に注入した: MEM(N=5), SeV-GFP(1×10 8 CIU/ml)を含むMEM(N=5), SeV/ Δ M-GFP(1×10 8 CIU/mlを含むMEM(N=7), SeV/ Γ MMP#2) Γ M-GFP(1×10 8 CIU/ml)を含むMEM(N=7)。2日後、もう一度同量のSeVを癌部位に注入した。癌部位の大きさの長径(a)、短径(b)、厚み(c)を1日おきに計測した。腫瘍体積は、楕円形とみなし、腫瘍体積V= π /6×abcで計算した。PBS,SeV-GFP,SeV/ Γ M-GFPは急速に癌が大きくなるのに対して、図37で示したようにベクターが癌全体に広がっていたSeV/ Γ MMP#2) Γ M-GFP投与癌は明らかに増殖せず小さいままであった。 t 検定による有意差検定でもP<0.05で有意に他の3群と比較して小さいことが判明した。これは治療遺伝子を搭載していないにもかかわらず、その抗癌効果があることが示している。

[実施例25] F非開裂/F改変M欠失型SeVベクターの作製と選択的感染

上記で用いた通常のSeVベクターの作製にはFの開裂を起こさせるために7.5 μ g/mlの高い濃度のトリプシンおよび 50U/mlのcollagenaseがはいった培地で培養、回収し、F開裂型SeVベクターとした(実施例17および18参照)。ここでは、感染時のプロテアーゼ依存的な選択を実現するため、作製時にプロテアーゼを加えずにSeVを回収し、F非開裂型SeVを作製した。

具体的には、10cm dishに LLC-MK2/F7/M62/A細胞をconfluentに培養した。実施 例17で調製した各F改変M欠失型SeV をMoi=5になるように感染させた。1時間後

、上澄みを取り2回 MEM培地で洗浄した。4ml MEMを加え32 $^{\circ}$ で培養した。5日後、上澄みを回収し、最終濃度が1%になるように Bovine Serum Albumin (BSA) を加えた。HAU titerを測定後、使用まで -70° で保存した。それぞれのF改変M欠失型SeVは $2^{7}\sim2^{10}$ HAU/ml (1 HAU = 1×10^{6} particles/ml のウイルス粒子に換算されるので $1\times10^{8}\sim1\times10^{9}$ particles/ml に相当する) の間で回収され、希釈により 1×10^{8} particles/ml にあわせた。

Exogeneous experimentの結果、LLC-MK2への感染が、SeV/F(MMP#2) ΔM-GFPは、MMP依存的に、SeV/F(uPA) ΔM-GFPは、uPAまたはtPA依存的に感染するベクターが作製できたことが確認された(exogeneous proteaseのデータは示さない)。MMP 発現株HT1080, tPA発現株MKN28, プロテアーゼをほとんど発現していないSW620で、プロテアーゼ発現による選択的感染が可能かどうかをendogenous experimentにより試みた(図38)。SeV/F(MMP#2) ΔM-GFPはMMP発現株HT1080で感染がみられるが、tPA発現株MKN28では、感染がみられない。SeV/F(uPA) ΔM-GFPは、tPA発現株MKN28では感染がみられるが、MMP発現株HT1080では感染がみられない。このようにプロテアーゼ発現依存的にそれぞれのSeVが感染の選択性が示された。

[実施例26] Human fibroblastによるMMP3, MMP7誘導によるF改変M欠失型SeV ベクターの感染

SW480およびWiDrはfibroblastと共培養、もしくはin vivoでの培養によってそれぞれMMP3, MMP7が誘導されることが示されている(Kataoka, H. et al. (1997) Oncol. Res. 9, 101-109; Mc Donnell, S. et al. (1999) Clin. Exp. Metastas is. 17, 341-349)。これらの細胞を使ってin vivoでF改変M欠失型SeVベクターの感染が変化するかどうか調べた。96 well plate にそれぞれの癌細胞株をconflue nt (5×10⁴ cell/well) になるように培養した。MEMで2回洗浄後、1 HAU/ml(1 HAU=1×10⁶ particles/ml のウイルス粒子に換算して 1×10⁶ particles/ml)のF非開裂型SeV含有MEMを50μ1加え、感染させた。5×10⁴ cell/well になるように Normal human lung fibroblast (TAKARA)を加え、4日間37℃で培養した(図39

)。SW480およびWiDrは、ともにhuman fibroblastをco-cultureすることによって、SeV/F(MMP#2) ΔM-GFPが感染するようになった。誘導のかからないSW620ではその現象はみられない。

[実施例27] ヒト大動脈平滑筋細胞へのF改変M欠失型SeVベクターのMMP選択的感染

MMPの発現異常の疾病は癌以外にも動脈硬化、リュウマチ、創傷治癒などで報告されている (Galis, Z.S., and Khatri, J.J. (2002) Circ. Res. 90, 251-262; Martel-Pelletier, J. et al. (2001) Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 15, 805-829)。

これらの疾患への応用の可能性を示すため、ヒト大動脈平滑筋細胞へのF改変M 欠失型SeVベクターのMMP選択的感染を試みた。96 well plate に human smooth m uscle cell (TAKARA) をconfluent (5×10⁵ cell/well) になるように培養した。MEMで2回洗浄後、SeV (F非開裂型: 1 HAU/ml(1×10⁶ particle/ml) 含有 MEMを5 0μ1加え、感染させた。同量50μ1のプロテアーゼ含有MEMを加え、4日間37℃で培養した。1mm² の細胞あたりのGFPの発現している細胞をカウントした(図40)。SeV/ΔM-GFPではtrypsinを加えることによってのみ感染が亢進したのに対して、SeV/F(MMP#2) ΔM-GFPではcollagenase, MMP2, MMP3, MMP9でその感染が亢進した。

[実施例28] F改変M欠失型SeVベクターのプロテアーゼ依存的Fの開裂実施例20でF改変M欠失型SeVベクターは、それぞれのプロテアーゼ分解配列をFタンパク質に組み込むことによって、M欠失型SeVは、その分解配列依存的に細胞融合型感染をすることを示した。さらに改変後にプロテアーゼ依存的にF0の開裂が起こっているかどうかウエスターンブロッティングによって確かめた。ウイルスのサンプリングは以下の方法で行った。SeV/ΔM, SeV/F(MMP#2)ΔM, SeV/F(uPA)ΔMの3種類のウイルス粒子をMOI=3でMタンパク誘導したヘルパー細胞に感染させた。感染2日後、上澄みを回収し、x18500gで3時間遠心し、その沈殿物をPB

Sで再けん濁した。それぞれのウイルス懸濁液に7.5μg/ml トリプシン、0.1 ng/ml MMP9, 0.1 ng/ml uPAの最終濃度になるようにプロテアーゼを添加し、37℃、30 min 処理後、サンプルバッファーを加え、SDS-PAGEサンプルとした。SDS-PAGE及びウェスターンプロッティングは定法に従って行った(Kido, H. et al. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. A possible activator of the viral fusion glycoprotein. J Biol Chem 267, 13573-9 (1992))。抗F1ウサギ抗体は3つの混合合成ペプチド(FFGAVIGT+Cys: 117-124, EAREAKRDIALIK: 143-155, CGTGRRPISQ DRS: 401-413; それぞれ配列番号: 46、47、48)を免疫し抗血清を得た。2次抗体にはHRP標識抗ウサギIgG抗体(ICN, Aurola, OH)を用い、発色の検出には化学蛍光法(ECL Western blotting detection reagents; Amersham Biosciences. Uppsala, Sweden)を用いた。図41には、Fを改変していないM欠失型SeVベクター(1,4,7,10),FにMMP#2 配列を挿入したM欠失型SeVベクター(2,5,8,11)、FにuPA配列を挿入したM欠失型SeV ベクター(3,6,9,12)を上記のプロテアーゼで37℃、30 分間処理したときの結果が示されている。

図41から分かるように、トリプシン存在下ではFを改変していないM欠失型SeV ベクターで、MMP存在下ではFにMMP#2 配列を挿入したM欠失型SeV ベクターで、ロPA存在下ではFにuPA配列を挿入したM欠失型SeV ベクターで、それぞれ挿入したプロテアーゼ基質に従って、F1への開裂が起こっていた。ここには示さないがuPA配列を挿入したM欠失型SeVベクターにおいてはトリプシン存在下で、その分解時間を4時間にするとF1への開列が見られた。これは実施例20の結果と合致し、Fの開裂依存的にシンシチウムの形成がおきていることが示された。

[実施例29] Fの細胞質ドメイン欠失による融合能の上昇

パラミクソウイルスによる宿主への侵入はウイルスの膜と宿主側の細胞膜の融合によって成立する。その侵入機構はセンダイウイルスのHNタンパクが宿主側のシアル酸に結合し、Fタンパクが細胞膜の融合を起こす。その際、HNの結合によっ

てFのコンフォメーションが変わることが重要であるとされている(Russell, C. J., Jardetzky, T. S. & Lamb, R. A. Membrane fusion machines of paramyxovirus es: capture of intermediates of fusion. Embo J 20, 4024-34 (2001))。そのため、ほとんどのパラミクソウイルスのFタンパクは単独で細胞に発現させても細胞同士の融合能がなく、HNを同時に発現した細胞のみ融合能を持つ。パラミクソウイルスにおいてFおよびHNの細胞質ドメイン(cytoplasmic domain)を削るとその融合能が上昇する事が知られている(Cathomen, T., Naim, H. Y. & Cattaneo, R. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. J Virol 72, 1224-34 (1998))。センダイウイルスにおいて、どのFの細胞質ドメインの欠失変異体が融合能を最もよく上昇させるかを、欠失変異体を作製し、pCAGGS発現ベクター(Niwa, H. et al. (1991)Gene. 108: 193-199)に搭載した後、pCAGGS搭載HNを同時にトランスフェクションし、その融合能をシンシチウムの数によって確認した。

Fのcytoplasmic domainを削った変異体遺伝子は、以下のプライマーによって、それぞれPCRを行い、断片をXho I, Not I 処理後、pCAGGSベクターにライゲーションした。Fct27 primer(5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3'/配列番号:49,5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCATCTGATCTTCGGCTCTAATGT-3'/配列番号:50),Fct14 primer(5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3'/配列番号:51,5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3'/配列番号:52),Fct4 primer(5'-CCGCTCGAGCATGACAGCATATATCCAGAGA-3'/配列番号:53,5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3'/配列番号:53,5'-ATAGTTTAGCGGCCGCTCACCTTCTGAGTCTATAAAGCAC-3'/配列番号:54)(Kobayashi M et al. J.Viol., vol7: 2607, 2003)。

細胞融合能の測定のため、LLCMK2もしくはHT1080細胞を24ウェルプレートへcon fluent になるようにまいた。 $50\,\mu\,1$ Opti-MEMに対して $3\,\mu\,1$ Fugene6を混合した。 $\rm ApCAGGS$ 発現プラスミドを $2\,\mu\,g\,$ と等量のpCAGGS/EGFPを混合後、Opti-MEMとFugen6 の混合液に加えた。室温で15分間放置後、 $\rm 500\,\mu\,1$ MEM培地に培地交換した24ウェ

ルプレートへ添加した。37℃, 5%CO₂ で3時間培養後、HT1080の場合 1% FBS添加M EM, LLCMK2の場合7.5μg/ml Trypsinもしくは指定された濃度のcollagenase type IV (Clostridium) を添加したMEM培地へ置換した。48時間培養後、倒立顕微鏡の100倍視野あたり(0.3 cm²)の融合したシンシチウムの数をカウントした。もしくは4% Paraformaldehyde固定を2時間後、70% エタノール,蒸留水置換後、5分間hematoxylin染色を行った後、水洗し、シンシチウムを形成している0.3 cm²当たりの核の数をカウントした。

3種類のFの細胞質ドメインの欠失させたアミノ酸配列を図42(A)に、その融合活性を図42(B)に示す。図42(B)で示すように、F単独では融合した細胞はないが、HNを共トランスフェクションすることによって融合能を示した。また、細胞質ドメインが14アミノ酸になるように28アミノ酸を削った配列のFタンパク質(Fct14)が最もその融合能が高いことが明らかになった。

[実施例30] F/HNキメラタンパクは融合能を飛躍的に上昇させる

パラミクソウイルスのエンベロープタンパクは、細胞膜上でFは3量体で、HNは4量体を形成しており、お互いの外部ドメイン (Ectodomain) およびMタンパク質を介して相互作用していることが明らかになっている (Plemper, R.K., Hammond, A.L. & Cattaneo, R. Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomer ize in the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 276, 44239-46 (2001))。図42で示したようにFは単独では融合能をもたず、HNが必須である。このことよりFとHNのキメラタンパクを作製し、同じ細胞膜上に同時に融合タンパクとしてFとHNを発現させることによって、より融合能の高いベクターの作製を試みた。FはII型の膜タンパクであり、HNはI型の膜タンパクであることより、図43(A)で示すように、2つの膜貫通ドメインを持つ細胞膜上でU字型を形成するようなキメラタンパクを作製した (Fct14/HN)。Fタンパクは融合能の高かったFct14を用いた。同時にその2つのタンパクの間に50アミノ酸からなるリンカー配列を挿入した (Fct 14/Linker/HN)。このリンカー配列は現在の検索ではどのタンパクにもホモロジー

を持たない配列である。 (Simian immunodeficiency virus (SIVagm) のenvのcyt oplasmic domainのアミノ酸配列のN末端とC末端を逆にして合成したnon-sense な配列を用いた。)

図43(B)で示すようにリンカー配列のないキメラタンパクでは低い融合能を示すのに対してリンカーを挿入することによってFとHNを同時にトランスフェクションすることに比べて約5倍その融合活性が飛躍的に上昇することが判明した。

[実施例31] 融合能の機能維持と基質特異性

Fタンパク質が融合能を獲得するためには、HNが同時に発現するだけではなく、プロテアーゼによってFタンパク質が2つのサブユニット (F1, F2) に開裂することが不可欠である。図42および43ではトリプシン存在下での融合能を測定しており、トリプシンがない状態では全く融合能がない。図43で示したFct14/Linker/HNキメラタンパクがMMP依存的に融合能を獲得するように、Fの開裂配列の改変を試みた。MMPの分解基質の配列については多くの報告があり、その中から8種

類の配列に対して改変を試みた。QuikChange^N Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) によって図44(A)のように開裂部位のアミノ酸配列を改変した。この改変で考慮したことは、プロテアーゼによる切断後のFusion peptideの配列である。パラミクソウイルスのFタンパク質のF1のN末端領域はFusion peptideと呼ばれ、その融合活性に重要であり、その領域のアミノ酸の変異が、Fタンパク質の融合能を消失する場合があることが報告されている (Bagai, S. & Lamb, R.A. A glycine to alanine substitution in the paramyxovirus SV5 fusion peptide increases the initial rate of fusion. Virology 238, 283-90 (1997))。そのため重要性が指摘されているF1のN末端領域配列はそのまま残存させることにした。その場合も、MMPの分解基質として一般的な6残基配列を導入する場合には、MMPによる分解後にF1のN末端に3残基が付加されるデザインとなり、MMPによる分解は起こったとしても、F蛋白の融合能に影響を与える可能性があると推測された。則ち、MMP依存的に開裂し活性化するF蛋白のデザインを行うには、MMPによる基質特異性と共に、開裂後のF蛋白の融合能の保持という2点を考慮してデザインを行うことが必須である。

MMP#1は最もMMPの合成基質としてよく知られている配列である。この配列はその他のMMPによるターゲッティングにも用いられている配列である。MMP#3および#8も合成基質として市販されている配列である。MMP#2,6は、MMP2,9の分解基質PLGMWSの配列をファージディスプレイ(phage display)で明らかになったMMP9に対するコンセンサス配列 Pro-X-X-Hy-(Ser/Thr)にしたがってPLGMTS,PQGMTSと改変した(それぞれ配列番号:61および62)。MMP#5はShneiderらの報告(American Society of Gene therapy, Annual meeting No.1163 2002, Boston)よりPQGLYA(配列番号:63)とした。MMP#4は分解後のFusion peptideの配列が改変されない。MMP#7はMMP2に対するphage displayで明らかになった配列である。

以下に、F/HN融合遺伝子のFの活性化部位を改変した発現プラスミドの調製の詳細を示した。F/HN融合遺伝子を構築後、pBluscript F/HN上で、Fの活性化部位の

変異を導入した。変異の導入には、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) を利用してKitに記載の方法に従って行った。変異導入に使用した合成オリゴの配列は、

F(MMP#1): (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCCtGggGttATTCTTCGGT GC TGTGATTGGTACTATCG-3'/配列番号: 6'4, 5'-CGATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAATaa CccCaGGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 6'5)、

F (MMP#2): (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCatGaCGAGtTTCTTCGGTGCTGTGATTGGTACTATC-3'/配列番号: 3 2, 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAACTCGtCatGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 3 3)、

F(MMP#3): (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCCtGggGttATTCTTCGGTGCTGTGATTGGTACTATCG-3'/配列番号: 3 4, 5'-CGATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAATaaCccCaGGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 3 5),

F(MMP#4): (5'-CAAAATGCCGGTGCTCCCCcGTtGgGATTCTTCGGTGCTGTGATT-3'/配列番号: 36,5'-AATCACAGCACCGAAGAATCcCaACgGGGGAGCACCGGCATTTTG-3'/配列番号: 37)

F(MMP#5): (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCcctCcagggCttGtatgctTTCTTCGGTGCTGTGATTGGTACTATC-3'/配列番号: 66,5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAagcataCaaGccctgAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 67)

F(MMP#6): (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTcaaggCatGaCGAGtTTCTTCGGTGCT GTGATTGGTACTATC-3'/配列番号: 6 8, 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAA aCTCGt CatGccttgAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 6 9)

F (MMP#7): (5' - CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCctTgcTtaCtataCGgctTTCTTCGGTGC
TGTGATTGGTACTATC-3'/配列番号: 7 O, 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAagcCGt
ataGtaAgcAagGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 7 1)

F (MMP#8): (5'-CTGTCACCAATGATACGACACAAAATGCCccTctTggCttGgCGAGaTTCTTCGGTGCT GTGATTGGTACTATC-3'/配列番号: 7 2, 5'-GATAGTACCAATCACAGCACCGAAGAAtCTCGcC aaGccAagAggGGCATTTTGTGTCGTATCATTGGTGACAG-3'/配列番号: 7 3)

小文字表記が変異導入塩基を示している。改変後、EcoRIで切り出し、pCAGGSへ ライゲーションを行った。

それぞれの配列を有するベクターとEGFP遺伝子を有するベクター(pCAGGS/EGFP)を等量混合し、MMPを高発現しているHT1080にトランスフェクションした。その結果、MMP#2及び#6の配列の遺伝子を導入した時のみ細胞融合が生じ、シンシチウムを形成した(図4(B))。これらの配列に共通であるのは、プロテアーゼによる切断後、F1タンパクのN末端にHy-S/T-S/T配列(MTS)が付加されることである。このことよりHy-S/T-S/T配列(特にMTS配列)の付加であれば、HT1080由来のMMPによるF蛋白の切断と共に、開裂後のF蛋白の融合能が保持されており、これら両者の必要条件を満たしている可能性が高いと考えられる。一方、MMP#1, #3, #4, #5, ,#7, および#8の場合、細胞融合が全く見られなかった。MMP#1を除くすべての配列はMMPの合成基質由来の配列なのでproteaseによる切断は生じていると予想されることから、F1に付加された3アミノ酸のペプチドが切断後のFタンパクの活性を限定している可能性が示唆された。また、MMP#4についてはこの条件ではプロテアーゼによる切断そのものが生じていない可能性が高い。その根拠として、データは示さないが、HT1080のPhorbol esterによるMMPの誘導によってMMP#4がシンシチウムの形成がみられるようになることでも明らかである。

さらにこのMMP#2, #6の配列の融合能の比較とともに#6のFusion peptide配列のN末端側から7番目と12番目の配列をGからAへ改変した配列についてMMP濃度依存的な細胞融合能を測定した(図45)。このF/HN融合遺伝子の変異導入に使用した合成オリゴの配列は、5'-CTTCGGTGCTGTGATTGcTACTATCGCACTTGcAGTGGCGACATCAGCAC-3'(配列番号:74)および5'-GTGCTGATGTCGCCACTgCAAGTGCGATAGTAgCAATCACAGCACCCGAAG-3'(配列番号:75)である。小文字表記が変異導入塩基を示している。発現プラスミドの調製は上記と同様に、変異を導入後にEcoRIで切り出し、pCAGSへライゲーションすることにより行なった。

その結果、MMP#6の方がMMP#2に比較して、2-3倍融合能が高いことがわかった。 重要な点はMMP#6の場合、低濃度のプロテアーゼ濃度条件下でも細胞融合が生じ、 低濃度でのFタンパクの活性化が実現していることである。しかしながら、Fタン パクの融合能の上昇する変異として報告されているGからAへの変異(Peisajovich , S.G., Epand, R.F., Epand, R.M. & Shai, Y. Sendai virus N-terminal fusio n peptide consists of two similar repeats, both of which contribute to me mbrane fusion. Eur J Biochem 269, 4342-50 (2002)) をさらに導入した場合 (# 6G12A) 、融合能が10分の1以下に減少してしまった。これらの結果より、プロ テアーゼによるトロピズムの改変のためプロテアーゼ分解配列を単に挿入するだ けではFタンパクの活性を維持することができずFusion能を失う場合が多いことが 明らかになった。目的とする分解配列を導入する場合、この系を用いて融合能の 確認を行いウイルスを構築することが可能である。また、このpCAGGSに搭載したF ct14/Linker/HNのキメラ遺伝子のみで顕著な融合活性を示すことより、このプラ スミド導入による抗癌効果があること推測される。さらに、このキメラタンパク をM欠失型センダイウイルスへ搭載することによってさらなる抗癌効果の上昇が期 待される。

[実施例32] 融合能を上昇させた改良型F改変M欠失型SeVゲノムcDNAの構築 実施例29および30においてpCAGGSベクターに搭載したFを改変することによって融合能が上昇することを示したが、同様の改変をM欠失型センダイウイルスベクターに行うことによって、融合能を上昇させた改良型F改変 Δ M SeVの作製を試みた。改良型F改変M欠失型SeVゲノムcDNAの遺伝子構築を以下の方法で行った。Se V/F(MMP#6) Δ M-GFPに関しては、実施例16と同様の方法で行った。F遺伝子への変異導入は配列番号:69のオリゴヌクレオチドを用い、LITMUSSall/NheIfrg Δ M-G FP上でQuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, LaJolla, CA)を利用してKit に記載の方法に従って行った。変異を導入したLITMUSSall/NheIfrg Δ M-G FPのSal I, Nhe I 消化後のフラグメントとF欠失部位にEGFP遺伝子を搭

載したF欠失型センダイウイルス全長ゲノムcDNA (pSeV+18/F-GFP:Li, H et al J. Viol. 74, 6564-6569 (2000), WOO00/70070) のSal I及びNhe Iで消化したNP遺伝 子を含むフラグメントをライゲーションし、SeV/F(MMP#6) AM-GFPのciNAを構築し た (図46)。Fタンパク質の細胞質ドメインの28アミノ酸を欠失させたM欠失型セ ンダイウイルス (SeV(TDK)/Fct14(MMP#6) ΔM-GFP) およびF/HNキメラタンパクを 搭載したM欠失型センダイウイルス (SeV (TDK) / Fct14 (MMP#6) / Linker/HN ΔM-GFP) の構築はマルチクローニングサイトセンダイウイルスcDNA (pSeV(TDK)と称す)(特開2002-272465) を基本骨格とした。Fタンパク質の細胞質ドメインをtrancate したM欠失型センダイウイルスSeV (TDK) /Fct14 (MMP#6) ΔM-GFPは以下のように構築 した。TDKを骨格にするため、まずpSeV(TDK)/ΔM-GFPを作製した。LITMUSSalI/Nh eIfrg AM-GFPを鋳型にして合成プライマー(Nhe-GFP-F: ATCCGCTAGCCCGTACGGCCAT GGTGAGCAAG (配列番号: 94) とGFP-EIS-BssHII: ATCCGCGCGCCCCGTACGATGAACTTTCA CCCTAAGTTTTTCTTACTACGGAGCTTTACTTGTACAGCTCGTC (配列番号:95)) を使ってPCR によって増幅したGFP/EIS(転写開始終結シグナルをコードする EIS配列を付加し たGFP)とマルチクローニングサイトセンダイウイルスcDNAをNheI, BssHII処理を し、フラグメントを ライゲーションすることによってMタンパクをGFPに置換し、 pSeV(TDK)/ A M-GFPを作製した。

さらに実施例31で作製したpCAGGS/Fct14(MMP#6)/Linker/HNを鋳型にして合成プライマーM1v-F: ATCCACGCGTCATGACAGCATATATCCAGAG (配列番号:96)、及びFct1 4-EIS-Sal I: ATCCGTCGACACGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACTTTAACGGTCATCT G GATTACC (配列番号:97)を使ってPCRによって増幅したFct14(MMP#6)をF遺伝子のかわりにFの位置に挿入、置換し、pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6) ΔM-GFPを構築した(図46)。次に、F/HNキメラタンパクを搭載したM欠失型センダイウイルス (pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HN ΔM-GFP)の構築を行った。GFPを鋳型にして合成プライマー (Nhe-GFP-F: ATCCGCTAGCCCGTACGGCCATGGTGAGCAAG (配列番号:98)とGFP-EIS-Sal I: ATCCGCTAGCCCGTACGATGAACTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGAGCTTTA

CTTGTACAGCTCGTC (配列番号:99)) を使ってPCRによって増幅したGFP/EISとマルチクローニングサイトセンダイウイルスcDNAをNhe I, Sal I処理をし、フラグメントを ライゲーションすることによってM遺伝子およびF遺伝子を欠失させ、GFPに置換した、pSeV(TDK)/ΔMΔF-GFPを作製した。さらに実施例31で作製したFct14 (MMP#6)/Linker/HNを鋳型にして、合成プライマー(F/HN5' Nhe-F: ATCCGCTAGCAGT TCAATGACAGCATATATCCAGAG (配列番号:100), F/HN3' Nhe-EIS-R: ATCCGCTAGCACG, ATGAACTTTCACCCTAAGTTTTCTTACTACTTTTAAGACTCGGCCTTGCATAA (配列番号:101))を使ってPCRによって増幅したFct14(MMP#6)/Linker/HNを上記のpSeV(TDK)/ΔMΔF-G FPのNhe I部位にライゲーションすることによってpSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linke r/HNΔM-GFPを構築した。

[実施例33] 改良型F改変M欠失型センダイウイルスの再構成と増幅

実施例32で構築したcDNAからのウィルスの再構成はLiらの報告 (Li, H.-O. et al., J. Virology 74. 6564-6569 (2000), W000/70070) に従って行った。しかし、実施例17と同様にM欠失型であるので、M蛋白をトランスに供給することが可能なヘルパー細胞(実施例11)を利用した。ヘルパー細胞作製にはCre/loxP発現誘導システムを利用している。当該システムはCre DNA リコンピナーゼにより遺伝子産物を誘導発現するように設計されたプラスミドpCALNdLw (Arai, T. et al., J. Virol. 72: 1115-1121 (1988))を利用したものであり、同プラスミドのトランスフォーマントにCre DNAリコンピナーゼを発現する組み換えアデノウィルス (AxCANCre)をSaitoらの方法 (Saito, I. et al., Nucl. Acid. Res. 23, 3816-3821 (1995), Arai, T. et al., J. Virol. 72, 1115-1121 (1998))で感染させて挿入遺伝子を発現させる。Fの活性化部位を変換したM欠失型SeVの再構成は以下のように行った。LLC-MK2細胞を 5×10⁶ cells/dishで100mmのシャーレに播き、24時間培養後、ソラレン (psoralen)と長波長紫外線 (365nm)で20分間処理

したT7ポリメラーゼを発現するリコンビナントワクシニアウィルス (PLWUV-VacT7

: Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8122-8126 (1986))

を室温で1時間感染させた (MOI 2)。細胞を無血清のMEMで洗浄した後、プラス ミドpSeV/F(MMP#6) ΔM-GFP (或いはpSeV(TDK)/Fct14(MMP#6) ΔM-GFP, pSeV(TDK)/ Fct14(MMP#6)/Linker/HN Δ M-GFP) , pGEM/NP, pGEM/P, pGEM/L (Kato, A. et al ., Genes cells 1, 569-579 (1996)) pGEM/M及びpGEM/F-HN (Li, H.-O. et al., J. Virology 74. 6564-6569 (2000), WO00/70070) をそれぞれ $12\,\mu$ g, $4\,\mu$ g, $2\,\mu$ g , 4μg, 4μg及び4μg/dishの量比でOpti-MEM (Gibco-BRL, Rockville, MD) に、 懸濁し、1μg DNA/5μL相当のSuperFect transfection reagent (Qiagen, Bothe 11, WA) を入れて混合し、室温で15分間放置後、最終的に3% FBSを含むOpti-MEM 3mLに入れ、細胞に添加して培養した。5時間培養後血清を含まないMEMで2回洗浄 L, 40 μ g/mL \mathcal{O} Cytosine β -D-arabinofuranoside (AraC : Sigma, St. Louis, MO) 及び7.5 µ g/mLのTrypsin (Gibco-BRL, Rockville, MD) を含むMEMで培養した 。24時間培養後、8.5×10° cells/dishあたりにF蛋白を持続発現する細胞(LLC-MK2/F7/M62/A : 実施例12) を重層し、40 μ g/mLの AraC及び7.5 μ g/mLのTrypsi nを含むMEMで更に2日間37℃で培養した(PO)。これらの細胞を回収し、ペレッ トを2mL/dishあたりの Opti-MEMに懸濁した。凍結融解を3回繰り換えした後、 ライゼートをそのままLLC-MK2/F7/M62/Aにトランスフェクションし、 40μ g/mLの AraC、7.5μg/mLのTrypsin及び50U/mLのtype IV collagenase (ICN, Aurola, OH) を含み(pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HN ΔM-GFPの場合trypsinのみ)血清を 含まないMEMを用い32℃で培養した (P1)。3~14日後培養上清の一部をとり、 新たに調整したLLC-MK2/F7/M62/Aに感染させ、 $40\,\mu$ g/mLの AraC、 $7.5\,\mu$ g/mLのTry psin及び50U/mLのtype IV collagenaseを含み(pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/H N ΔM-GFPの場合trypsinのみ)血清を含まないMEMを用い32℃で培養した(P2)。 $3\sim14$ 日後に新たに調整したLLC-MK2/F7/M62/Aに再度感染させ、 $7.5\,\mu$ g/mLの ${\rm Tr}$ ypsin及び50U/mLのtype IV collagenaseを含み (pSeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker /HN ΔM-GFPの場合trypsinのみ)血清を含まないMEMを用い32℃で3~7日間培養 した (P3)。回収した培養上清に終濃度1%になるようにBSAを添加し-80℃にて保

存した。保存ウィルス液を解凍し、その後の生産及びin vitro実験に供した。

以上のように、F蛋白質開裂部位をPLGMTS (配列番号:61) からPQGMTS (配列番号:62) にしたSeV/F (MMP#6) Δ M-GFP、cytoplasmic domain を28アミノ酸削ったSeV (TDK) /Fct14 (MMP#6) Δ M-GFP、およびF/HNのキメラタンパクを搭載したSeV (TDK) /Fct14 (MMP#6) /Linker/HN Δ M-GFPの作製に成功した。

[実施例34] 改良型F改変M欠失型センダイウイルスベクターの融合活性の上 昇

実施例33で製造したウィルスの性能を調べるため、以下のようにMMP2およびMMP9の発現量の違う様々な癌細胞株とMMPの発現が検出されないLLCMK2へ感染させ細胞融合能を測定した(図47)。各種癌細胞(HT1080, U87MG, A172, U251, SW480, LLCMK2)を供与先より指示された培地で24well plateへconfluent になるようにまいた。U87MG (ATCC NO. HTB-14), A172 (ATCC No. CRL-1620) はATCCより購入した。U251 (IF050288) はJCRB cell bank より購入した。MEM培地で2回洗浄後、それぞれのM欠失型センダイウイルスベクター(SeV/ΔM-GFP)をMOI=0.1で感染させた。室温で1時間放置後、MEM培地で洗浄し、0.5 mlの1%FBS添加MEMを24well plateに加えた。48時間培養後、倒立顕微鏡の100倍視野あたり(0.3 cm²)の融合したシンシチウムの数をカウントした。もしくは4%Paraformaldehydeを使用して2時間固定処理を行なった後、70%エタノール、蒸留水置換後、5分間hematoxylin染色を行い、水洗後、シンシチウムを形成している0.3 cm²当たりの核の数をカウントした。結果を図49に示した。

MMP2,9の発現は実施例22で行ったgelatin zymographyによって確かめた(図48)。その結果、HT1080,U87MG,A172でMMP2の発現が確認された。またU251とSW480で低いMMP9の発現が確認された。LLCMK2でMMP2の発現があるようにみえるのは1%血清を含んでいるため、血清中のMMP2の活性が見えている。それぞれの癌細胞株に感染後2日後、GFPの広がりを観察した。その結果、従来型のSeV/F(MMP#2) Δ M-GFPでは広がらなかったU251,SW480において改良型F改変M欠失型センダイウ

イルスベクターにおいて、特にF/HNキメラタンパクを搭載したM欠失型センダイウイルスベクター (SeV(TDK)/Fct14(MMP#6)/Linker/HNΔM-GFP) で融合活性がみられるようになった。データでは示さないが、マウス肺癌Lewis lung carcinoma, およびマウス大腸癌colon 26においても、同様に改良型にすることによって、M欠失型センダイウイルスベクター感染後、融合活性が見られるようになり、改良型にすることによってさらなる効果の増大と低い濃度のMMP量の癌にも効果が期待される。

産業上の利用の可能性

本発明により、所望のプロテアーゼ存在下で特異的に感染を広げるベクターが 提供された。本発明のベクターはウイルス様粒子を有意に産生せず、細胞融合に より隣接する周囲の細胞にベクターを伝達する。従って、本発明のベクターは、 目的とする組織の局所に限局してベクターを感染させるために有用である。特に 本発明により癌特異的に感染を広げるベクターが提供された。このベクターは、 腫瘍増殖に対する強い抑制作用を持っている。本発明のベクターを用いた癌の遺 伝子治療は、副作用の少ない新たな癌治療として高い可能性を持っている。

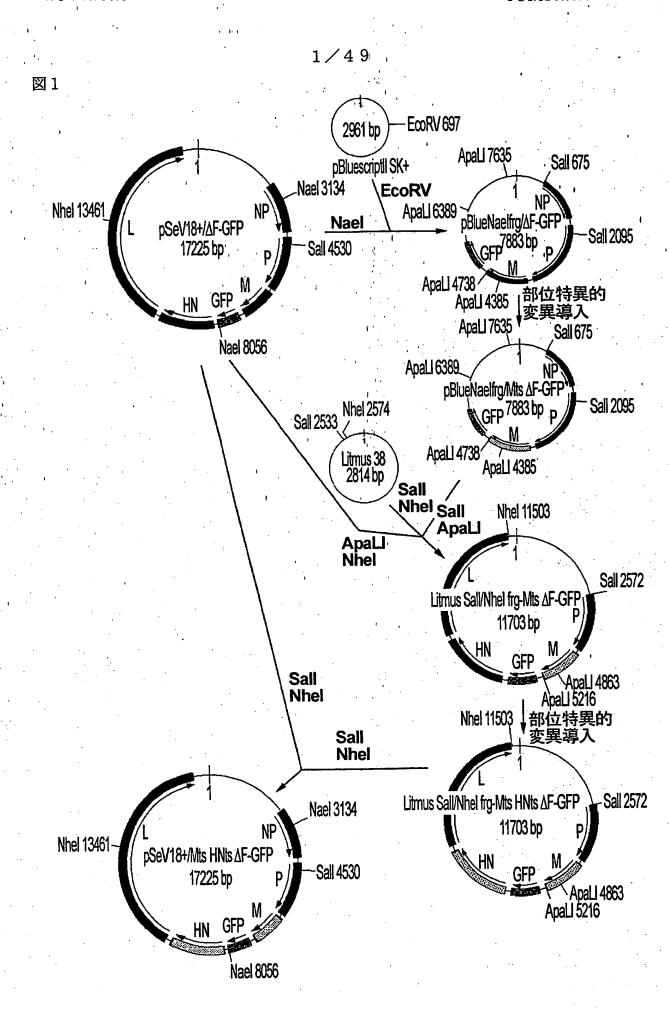
請求の範囲

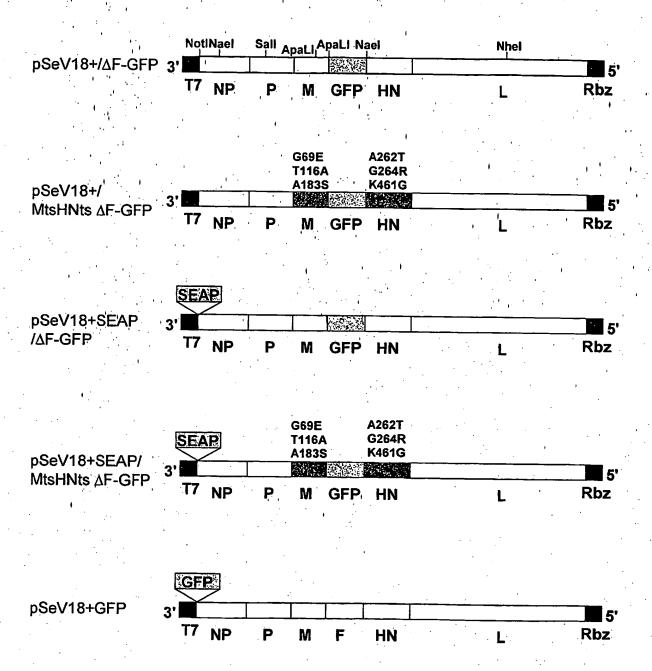
- 1. パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a) M蛋白質をコードする核酸が変異または欠失しており、かつ(b) 改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを含む複合体であり、以下の性質を有する複合体。
 - (1) 該複合体が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有する。
 - (2) 宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失している
- (3) 該プロテアーゼの存在に依存して、該複合体が導入された細胞と接触する 細胞に、該RNAを導入する能力を有する。
- 2. ウイルス粒子である、請求項1に記載の複合体。
- 3. 野生型F蛋白質をさらに含む、請求項2に記載の複合体。
- 4. 該パラミクソウイルスがセンダイウイルスである、請求項1から3のいずれかに記載の複合体。
- 5. 該プロテアーゼが、癌で活性が亢進するプロテアーゼである、請求項1から 4のいずれかに記載の複合体。
- 6. 該プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテアーゼまたはプラスミノーゲンアクチベーターである、請求項1から5のいずれかに記載の複合体。
- 7. 該プロテアーゼによって開裂される配列が、Pro-Leu-Gly、Pro-Gln-Gly、またはVal-Gly-Argを含む、請求項1から6のいずれかに記載の複合体。
- 8. 該改変F蛋白質において、野生型F蛋白質が持つ細胞質ドメインの一部が欠失している、請求項1から7のいずれかに記載の複合体。
- 9. 該改変F蛋白質がHN蛋白質と融合している、請求項1から8のいずれかに記載の複合体。

- 10. パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a) M蛋白質をコードする核酸が変異または欠失しており、かつ(b) 改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを有するウイルス粒子であって、(1
-)該ウイルス粒子が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有し、(2
-)宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失しており、(
- 3) 該プロテアーゼの存在に依存して、該ゲノムRNAを有するウイルス粒子が導入 された細胞と接触する細胞に、該ゲノムRNAを導入する能力を有するウイルス粒子 の製造方法であって、
- (i) パラミクソウイルスの野生型M蛋白質を発現する細胞において、該パラミクソウイルスのN、P、およびL蛋白質、および該ゲノムRNAを含むRNPを増幅させる工程、
 - (ii) 該細胞の培養上清に放出されたウイルス粒子を回収する工程、を含む方法
- 11. パラミクソウイルスのゲノムRNAであって、(a)条件的変異を有するM蛋白質をコードし、かつ(b)改変F蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質をコードするゲノムRNAを有するウイルス粒子であって、(1)該ウイルス粒子が導入された細胞内で該ゲノムRNAを複製する能力を有し、(2)宿主内環境においてウイルス粒子の産生が有意に低下または喪失しており、(3)該プロテアーゼの存在に依存して、該ゲノムRNAを有するウイルス粒子が導入された細胞と接触する細胞に、該ゲノムRNAを導入する能力を有するウイルス粒子の製造方法であって、
- (i) 該M変異蛋白質の許容条件下、細胞内で該パラミクソウイルスのN、P、およびL蛋白質、および該ゲノムRNAを含むRNPを増幅させる工程
 - (ii) 該細胞の培養上清に放出されたウイルス粒子を回収する工程、を含む方法

- 12. 工程(i)を35℃以下で行う、請求項10または11に記載の方法。
- 13. 工程(i) ~ (ii) の少なくともいずれかの時期において該改変F蛋白質を開裂させるプロテアーゼを存在させるか、あるいは工程(ii) において回収されたウイルス粒子を該プロテアーゼで処理する工程を含む、請求項10または11に記載の製造方法。
- 14. 工程(i) において該細胞内でパラミクソウイルスの野生型F蛋白質を発現させ、工程(i) ~ (ii) の少なくともいずれかの時期に該野生型F蛋白質を開裂するプロテアーゼを存在させるか、あるいは工程(ii) において回収されたウイルス粒子を該プロテアーゼで処理する工程を含む、請求項10または11に記載の製造方法。
- 15. 請求項5に記載の複合体および薬学的に許容される担体を含む癌の治療組成物。
- 16. パラミクソウイルスF蛋白質の改変蛋白質であって、開裂部位にPro-Leu-Gly、Pro-Gln-Gly、またはVal-Gly-Argを含み、マトリックスメタロプロテアーゼまたはプラスミノーゲンアクチベーターの存在下で細胞融合能を示す組み換え蛋白質。
- 17. 請求項16に記載の蛋白質をコードする核酸。
- 18. 請求項16に記載の蛋白質または該蛋白質をコードする核酸を含むウイルス粒子。
- 19. パラミクソウイルスF蛋白質およびHN蛋白質の膜貫通領域を持ち、細胞質側において互いの蛋白質が結合している融合蛋白質であって、細胞融合活性を持つ蛋白質。
- 20. 請求項19に記載の融合蛋白質であって、該蛋白質の開裂部位の配列が、 野生型F蛋白質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換された蛋白質。

- 21. 請求項19に記載の蛋白質をコードする核酸。
- 22. 請求項21に記載の核酸を含むベクター。
- 23. 請求項19に記載の蛋白質または該蛋白質をコードする核酸を含むウイルス粒子。





温度感受性 (プラークアッセイ)

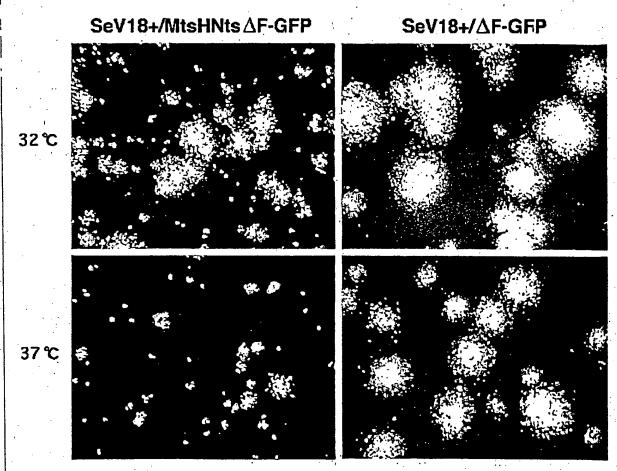


図4

LLC-MK2/F6/A: F発現

抗F抗体

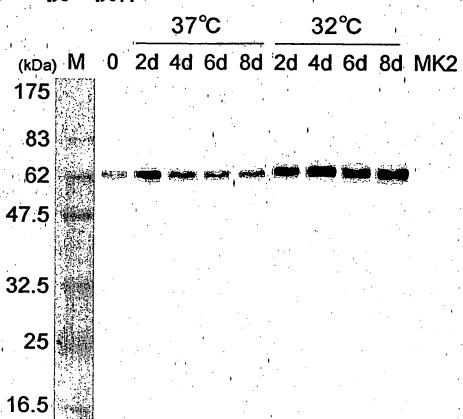
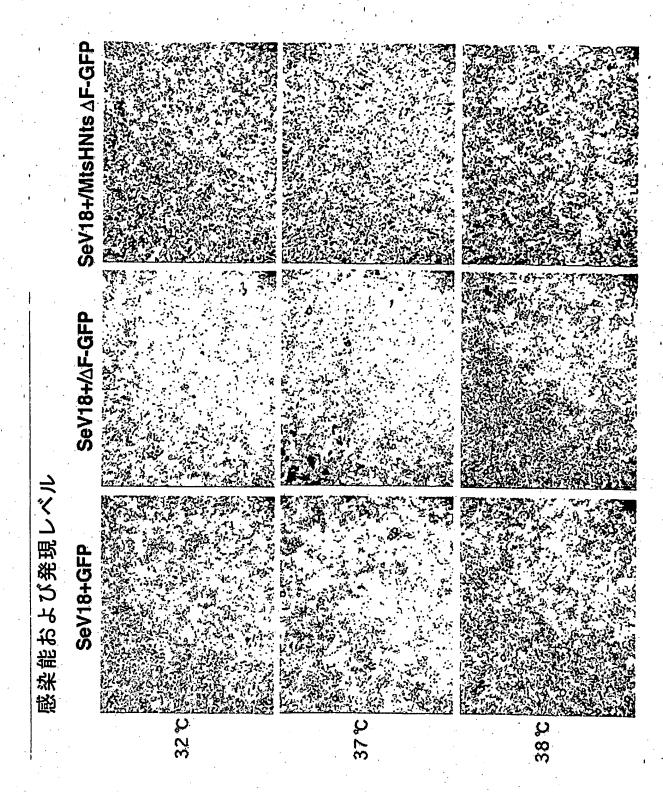
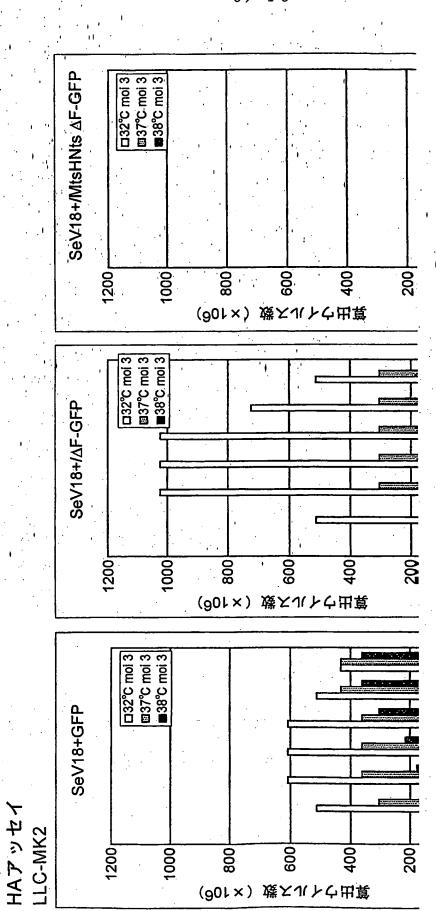


図 5

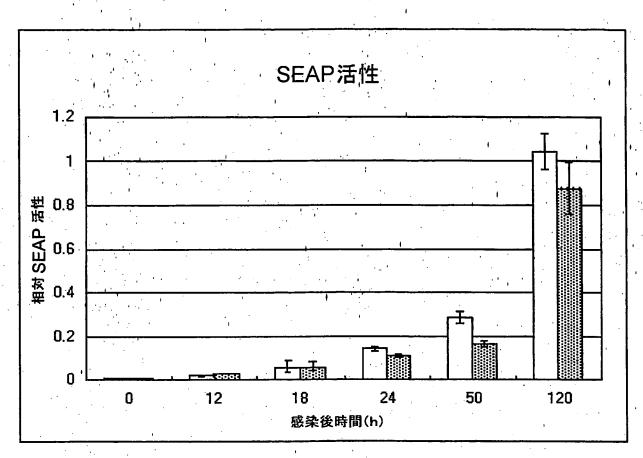




7/4.9

図7.

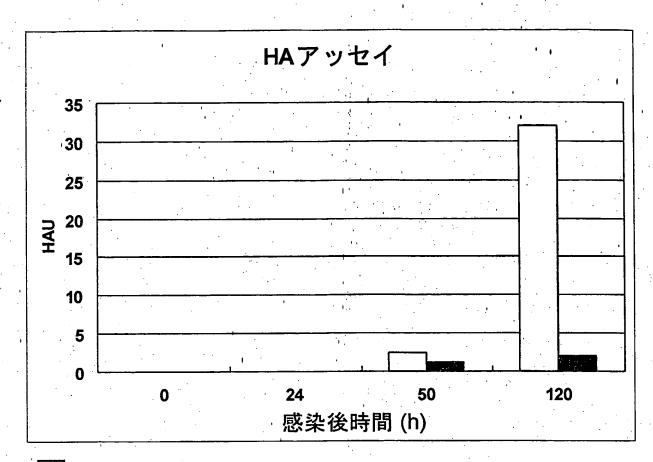
SeV18+GFP	SeV18+/∆F-GFP	SeV18+/ MtsHNts∆F-GFP						
上清 細胞	上清 細胞	上清 細胞						
_		(kDa) -47.5						
_	$\frac{1}{2} \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{2} \right)^{\frac{1}{2}} = \frac{1}$	—32.5						
60% 40%	30% 70%	8% 92%						
		m.o.i. 3 48 p.i. hours 37 °C						



SeV18+SEAP/ΔF-GFP

SeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFP

図 9



SeV18+SEAP/ΔF-GFP

SeV18+SEAP/MtsHNts ΔF-GFP

WO 03/093476 PCT/JP03/05528

10/49

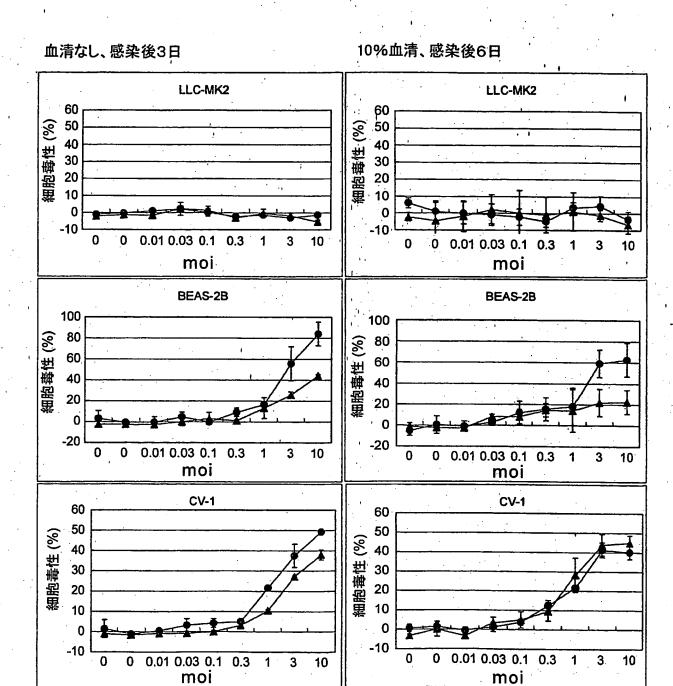
図10

SeV18+SEAP SeV18+SEAP ^AF-GFP MtsHNts ^AF-GFP

M 24 50 120 24 50 120 感染後時間

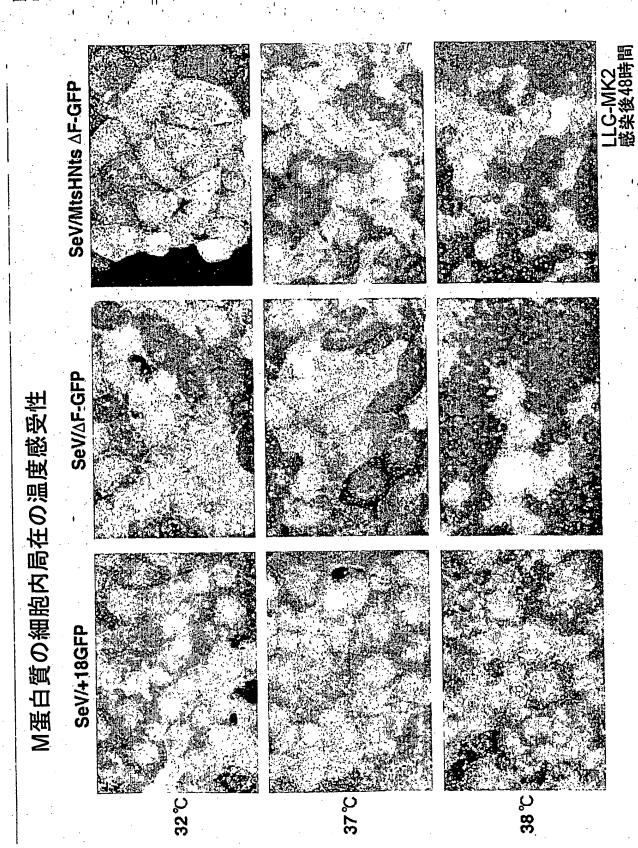
(kDa) M 47.5

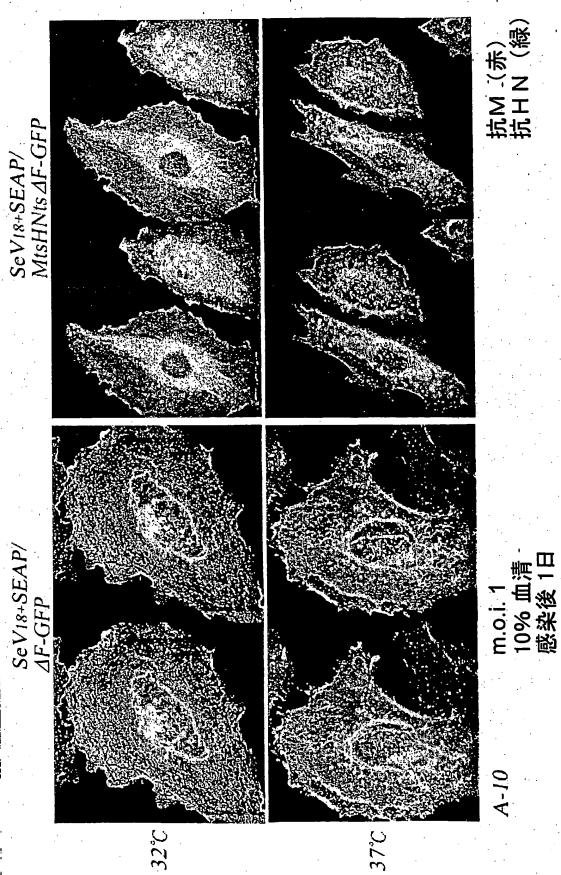
32.5

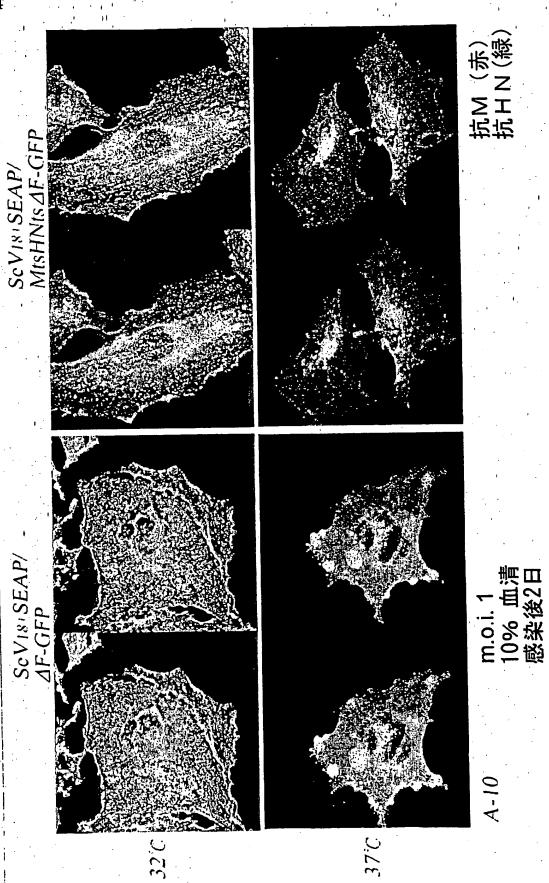


SeV+18/∆F-GFP

▲ : SeV+18/MtsHNts∆F-GFP

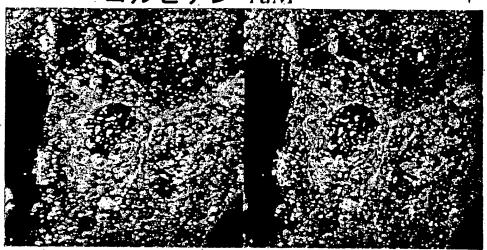




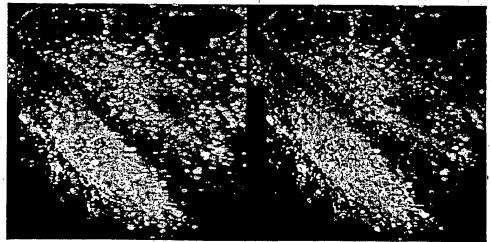


ScV18+SEAP/ MtsHNts \(\Delta F-GFP \)

コルヒチン luM



コルセミド JuM

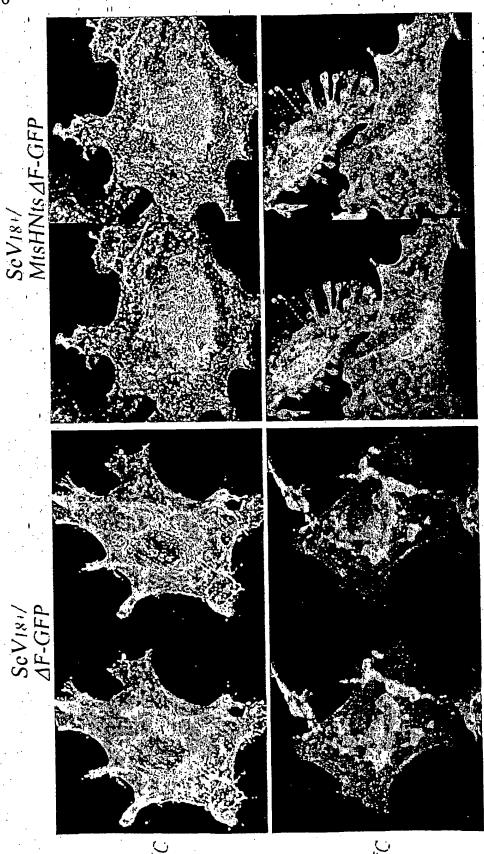


A-10

抗M(赤) 抗HN(緑)

m.o.i. 1 10%血清 32℃インキュベーション 感染後 2 日



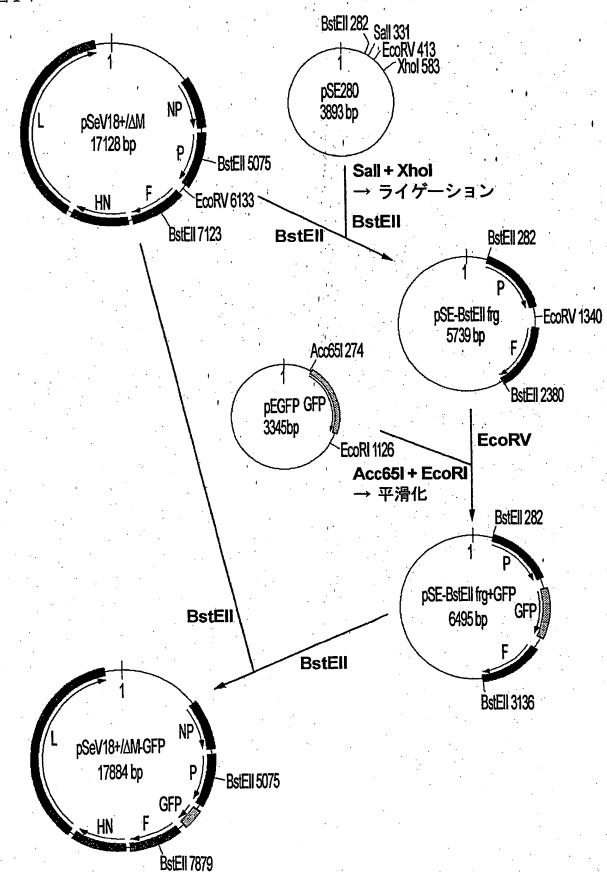


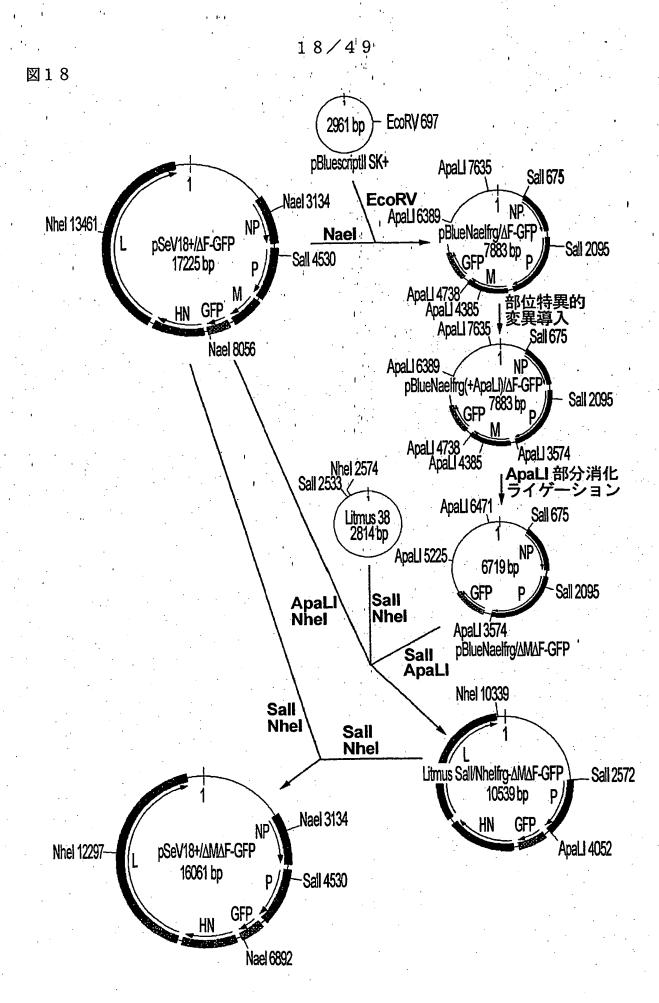
m.o.i. 1 10% 血清 感染後2日

A-10

17/49







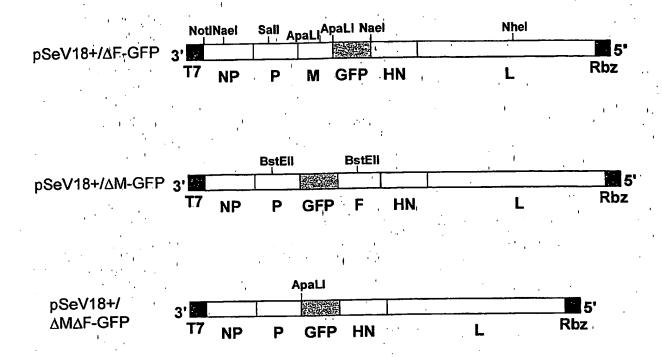
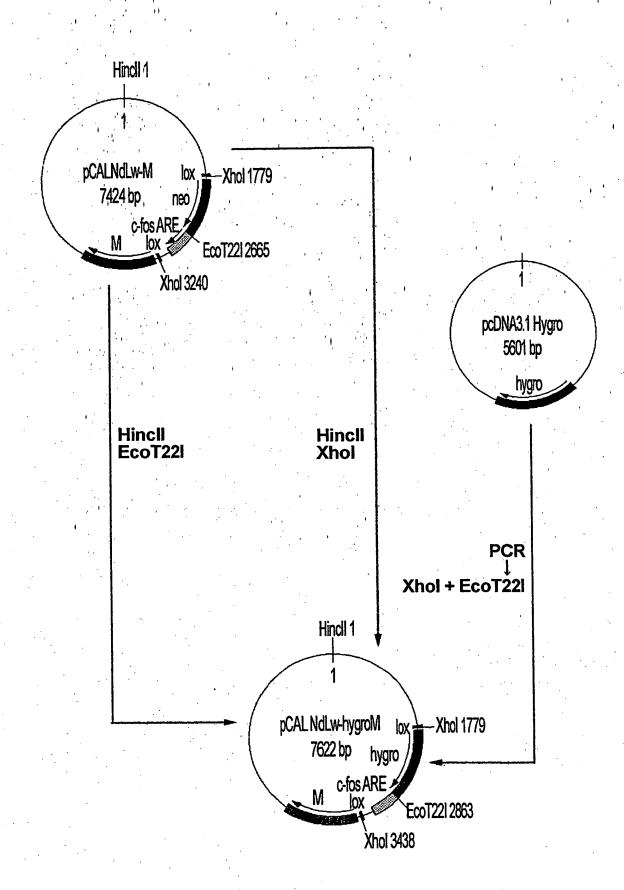
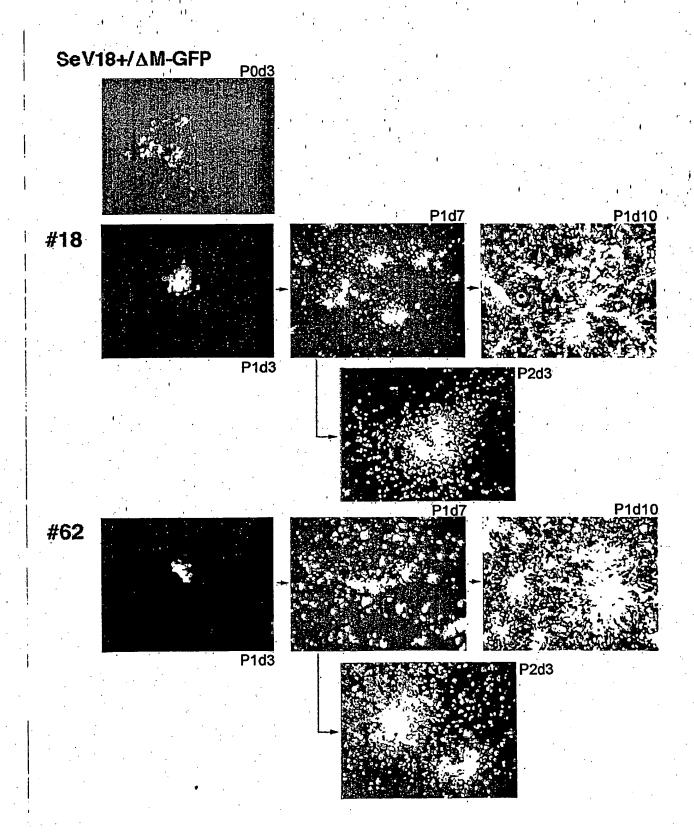
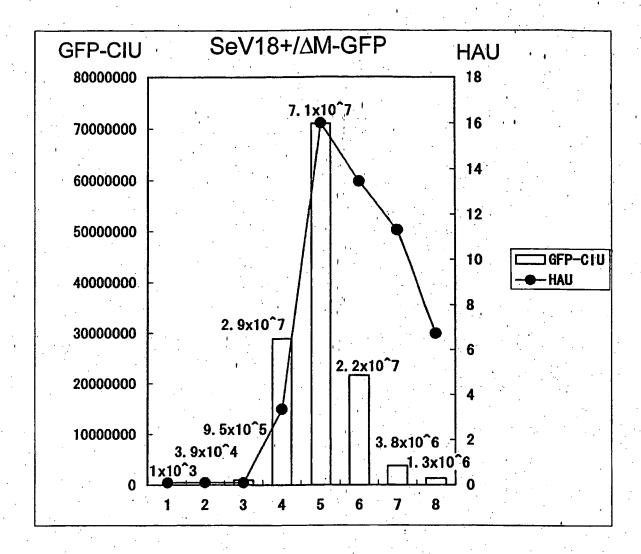


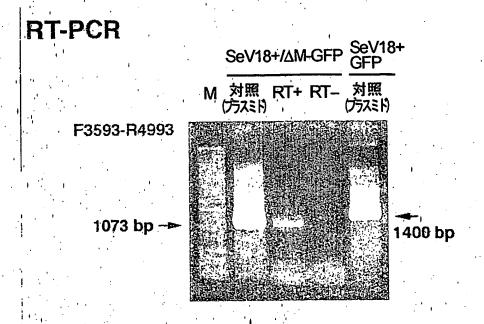
図20

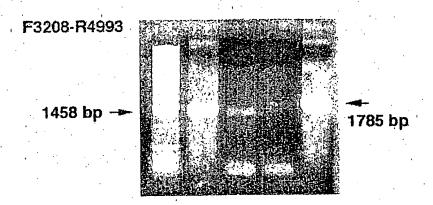


. ,	抗	M			•				.•				•	抗	F	•					• •		
				クローン番号											,	1		ーン番号					. 1
(kDa) 175	M	14	18	19	23	30 30	51	62 ිධ	66	129		•		14	18	19	23	30	51	62	66 129	M	(kDa) 175
83	•			•			•					,	+ _! -0										83
62		٠.	٠.					•		• ••		F	-				i diye.=	•		NUT A	ere 10/4	٠	62
47.	5 * ***	- 187 - 28		ijik Se		Ž.	29		1	 	_	-14) 		;							•••	47.
32.	5 -,		4CF+27			_,_	- LC,			 .	_		 								:	r:	32.
25	Mr.											٠. :										12.02	25









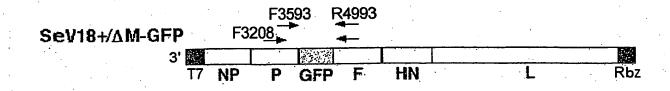


図25

ウェスタンブロッティング

LLC-MK2 m.o.i. 3 感染後3日

細胞 ウイルス
18+ΔFΔM 18+ΔFΔM (kDa)
83
62
47.5

18+ΔFΔM 18+ΔFΔM

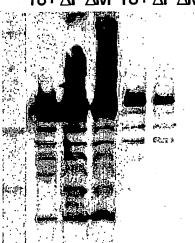
抗F

抗M



18+ΔFΔM 18+ΔFΔM

抗SeV (DN-1)



175

83

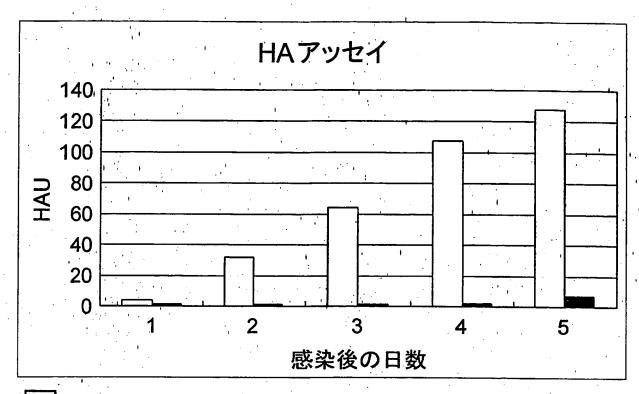
·• 62

47.5

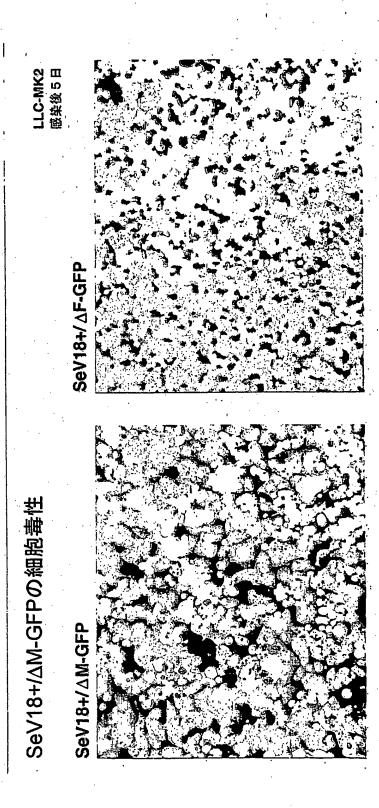
32.5

.27/49

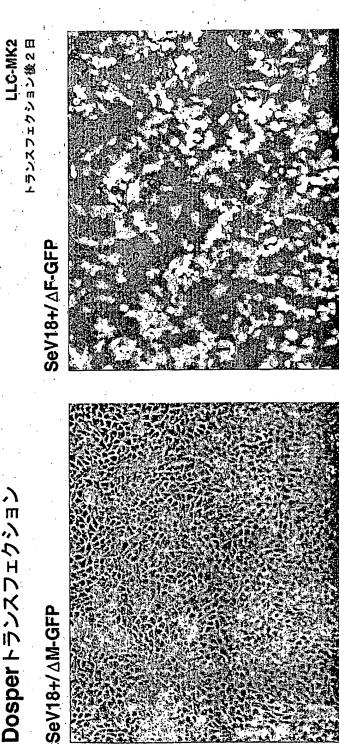
図27



SeV18+/△F-GFP
SeV18+/△M-GFP



Dosperトランスフェクション



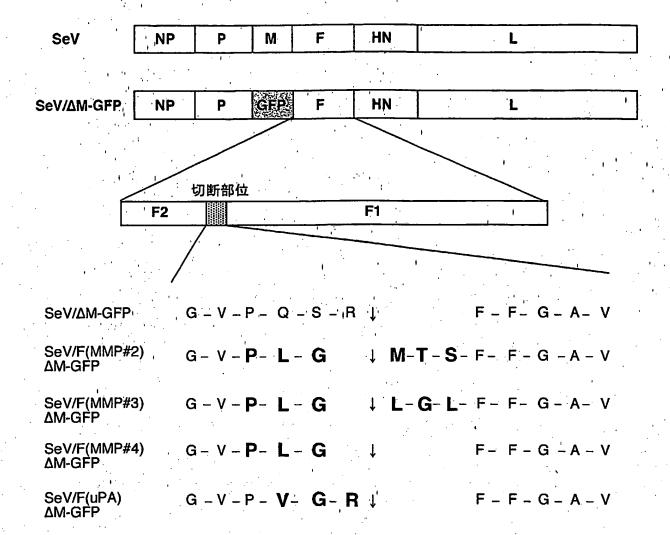
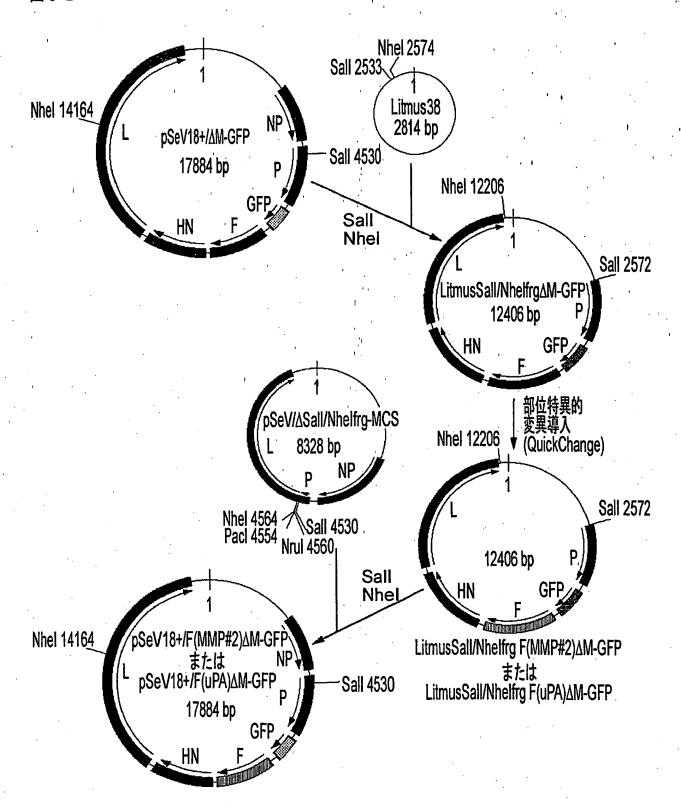
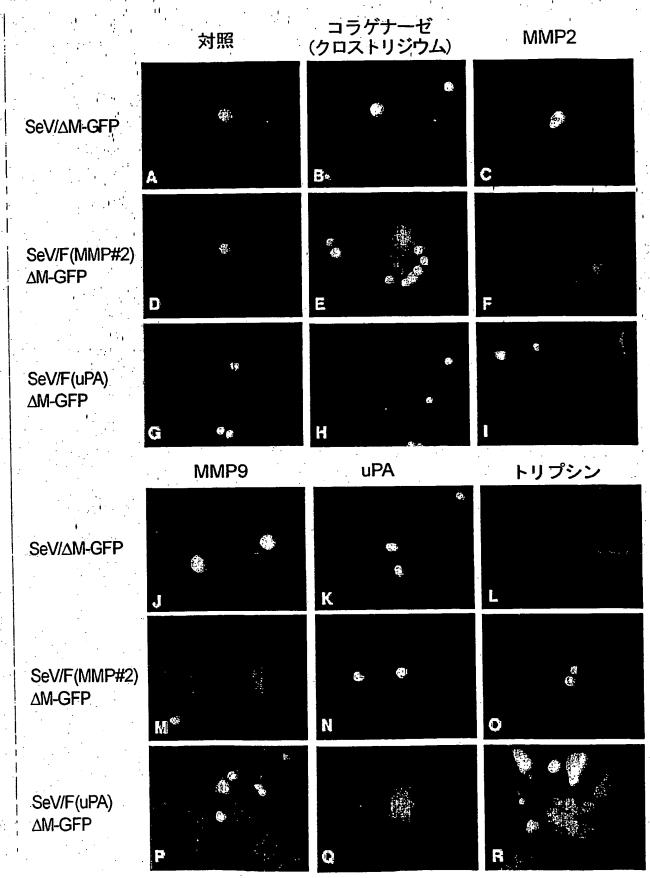


図31





3 3 / 4 9

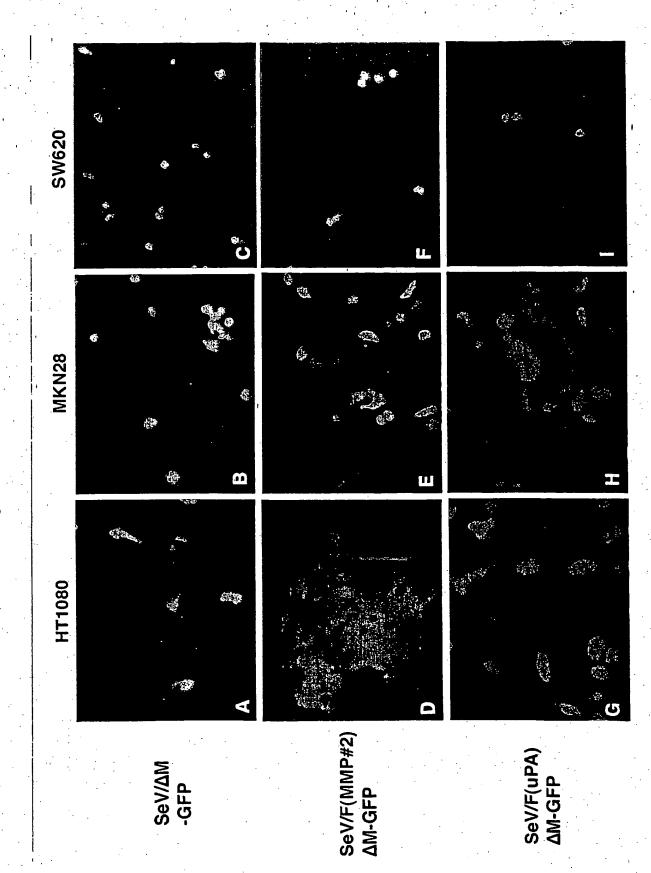
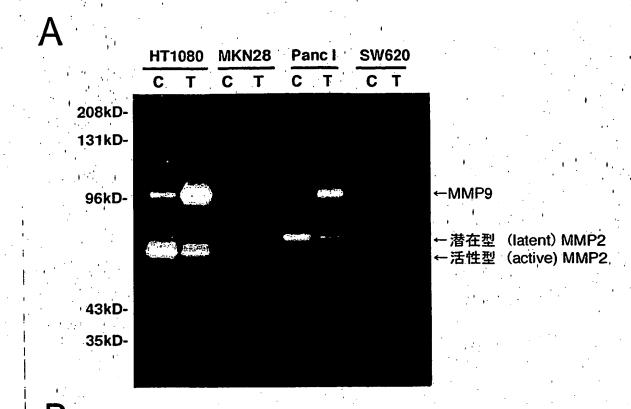
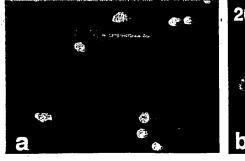


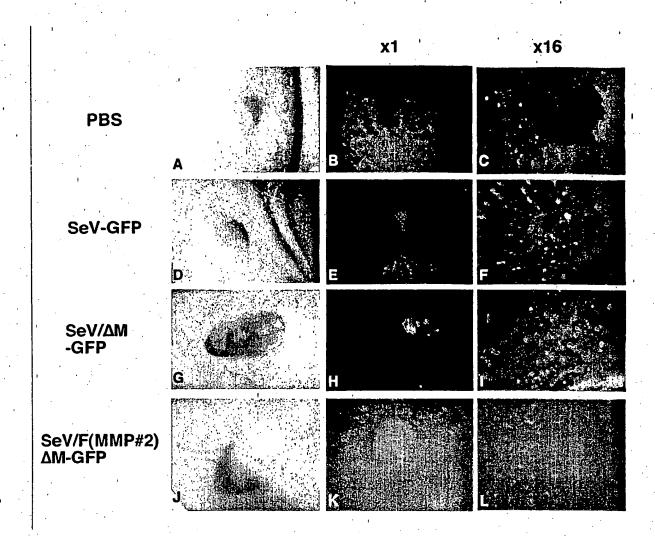
図34

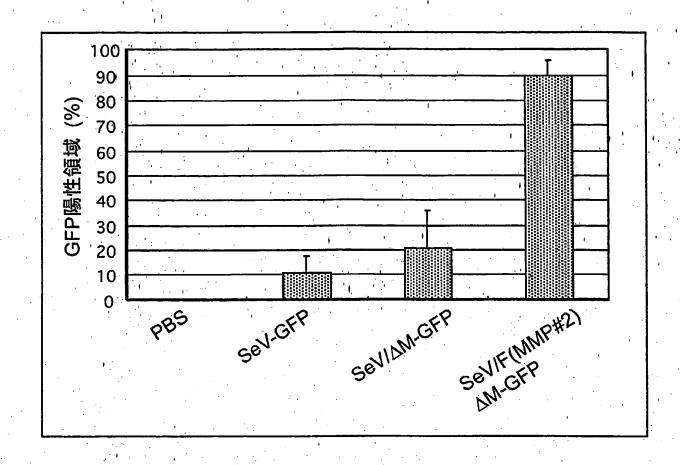


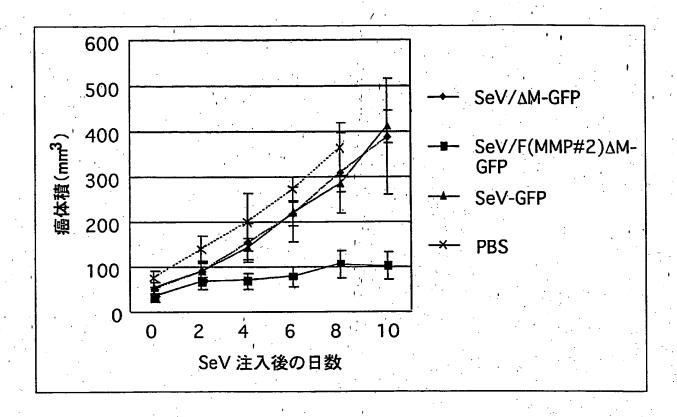
Panc I
SeV/F(MMP#2)ΔM-GFP





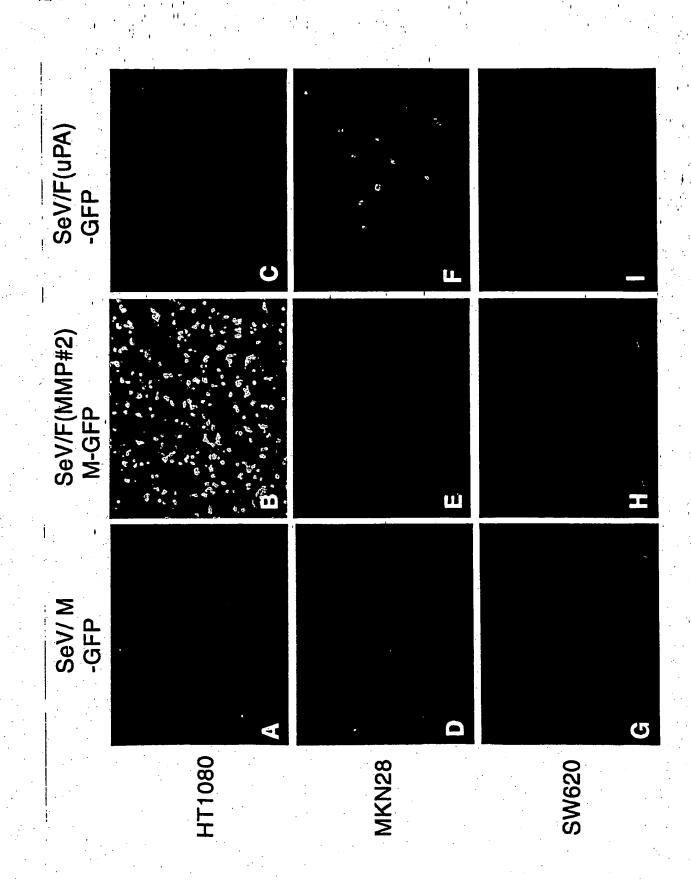






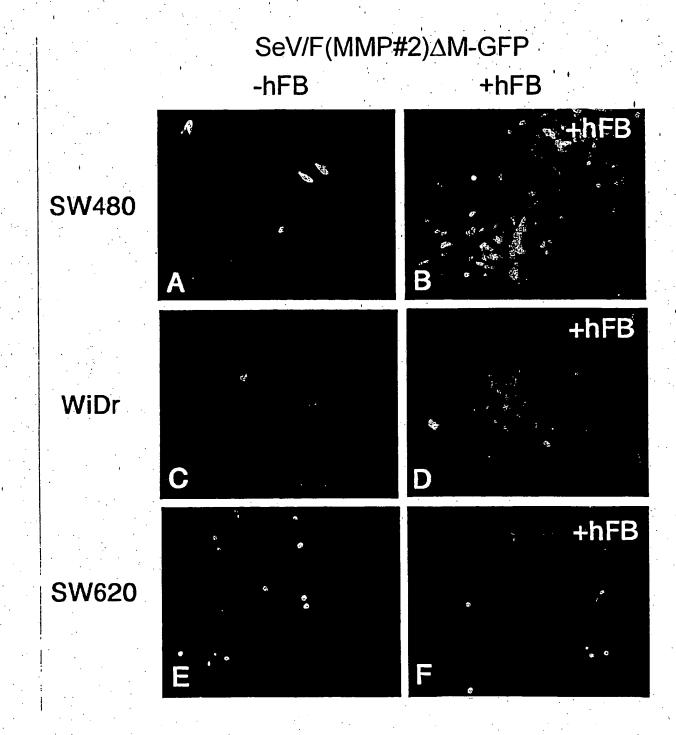
38/49

図38



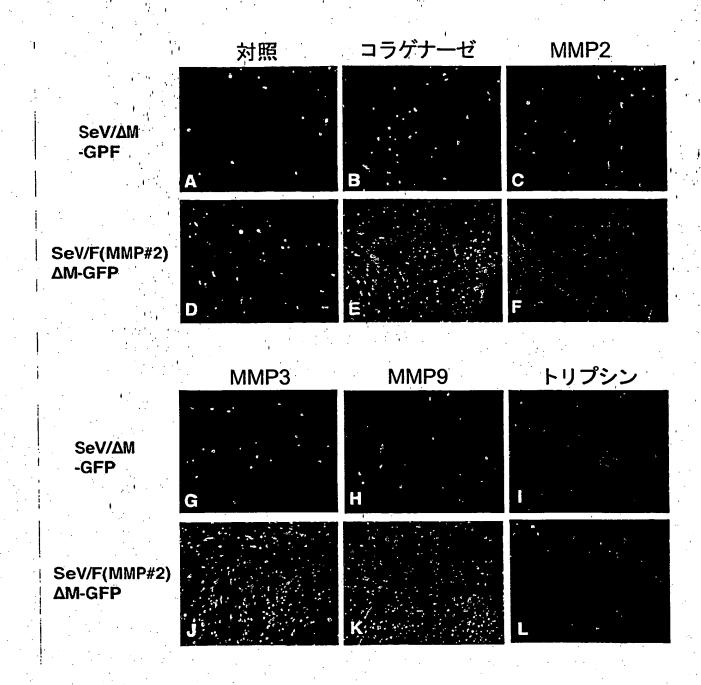
WO 03/093476 PCT/JP03/05528

39/49



WO 03/093476 PCT/JP03/05528

40/49



WO 03/093476 PCT/JP03/05528

41/49

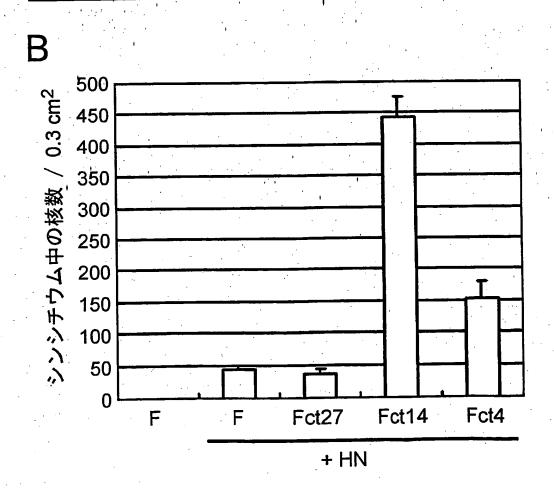
図41

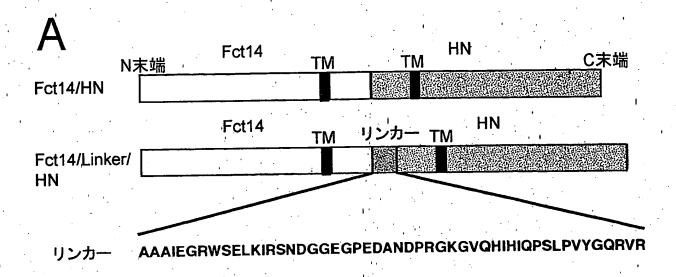
17-

図42

A

	TM	細胞質ドメイン			
Fct42(WT)	VIVIVLY	RLKRSMLMGNPDDRIPRDTYTLEPKIRHMYTKGGFDAMAEKR			
Fct27	VIVIVLY	RLKRSMLMGNPDDRIPRDTYTLEPKIR			
Fct14	VIVIVLY	RLKRSMLMGNPDDR			
Fct4	VIVIVLY	RLKR			





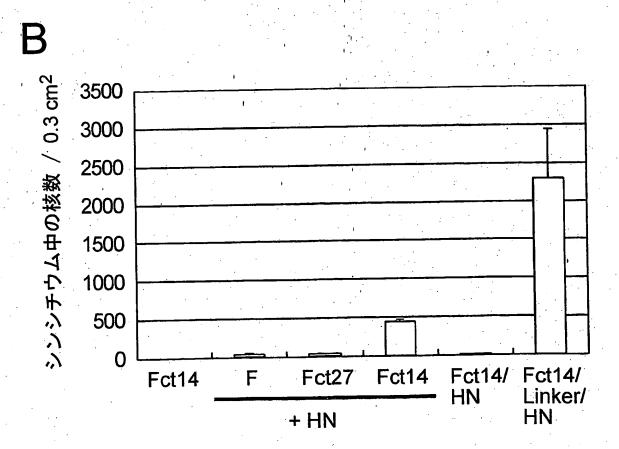
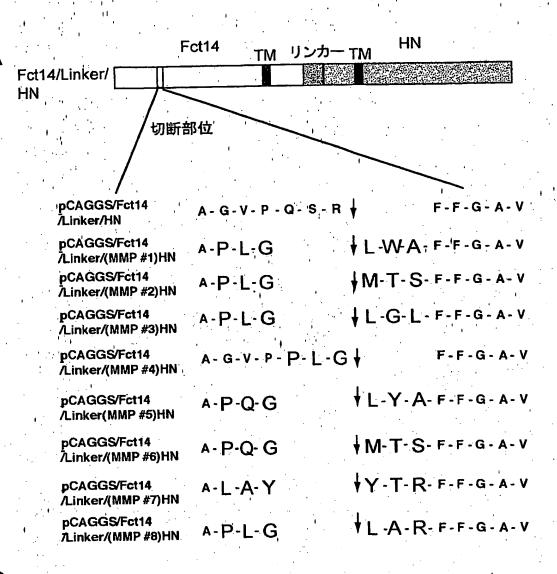
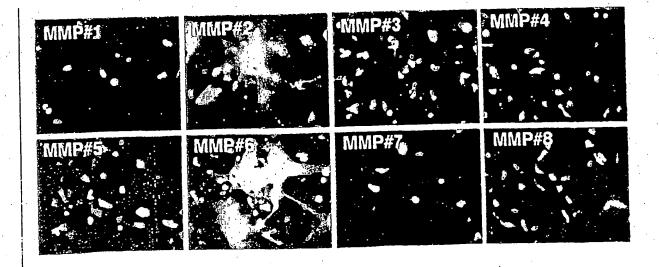


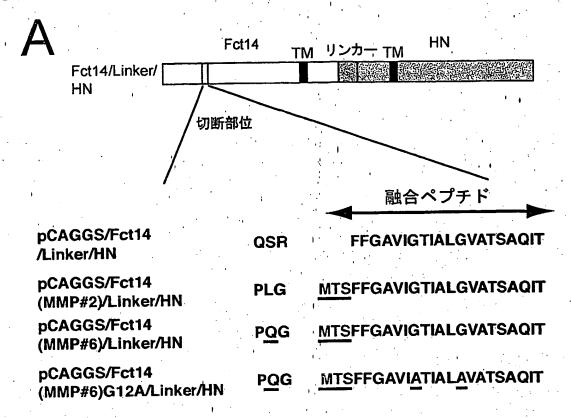
図44

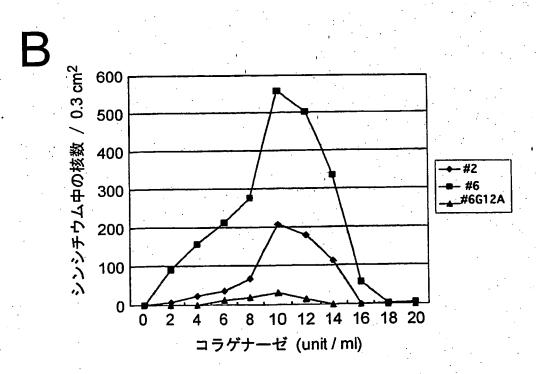
A

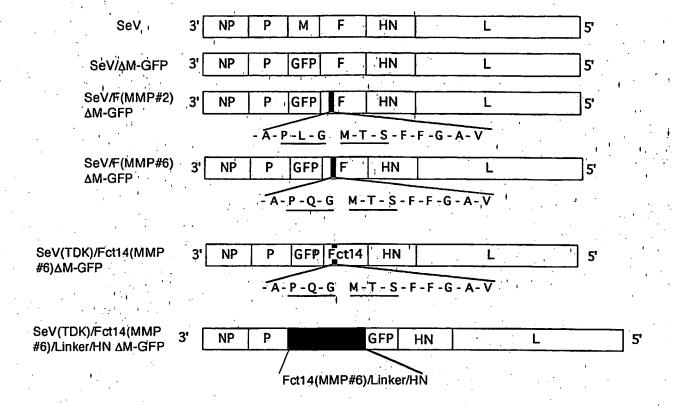


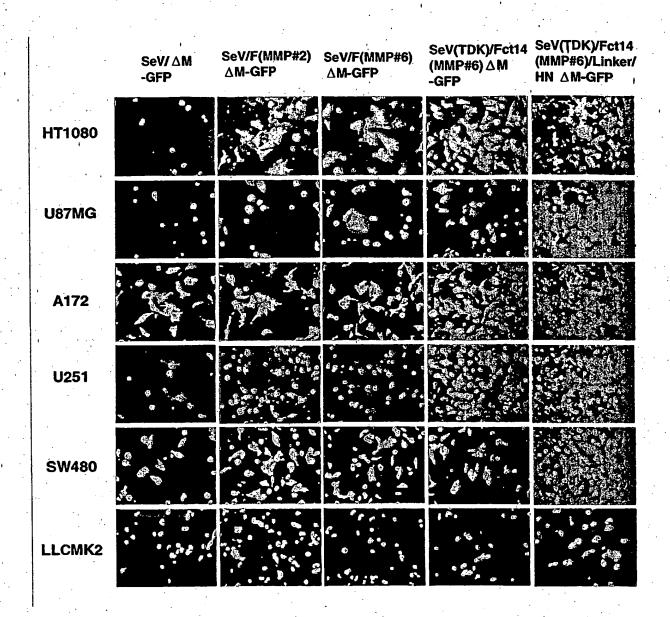
B









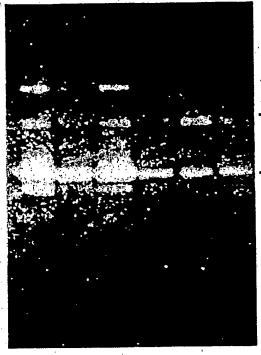


PCT/JP03/05528

48/49

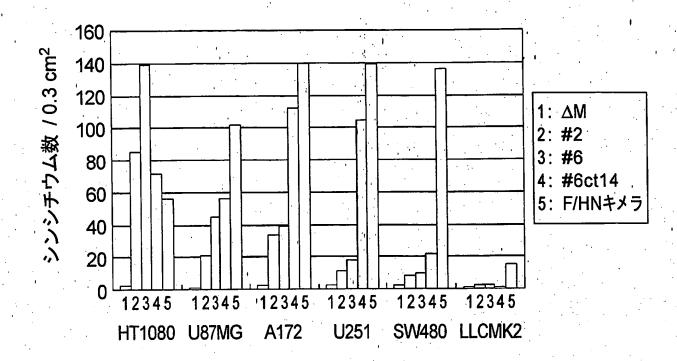
図48

HT1080 U87MG A172 U251 SW480



-MMP9

-MMP2



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> A vector with an altered tropism of protease dependency

<130> D3-A0202P

<150> JP 2002-129351

<151> 2002-04-30

<160> 101

<170> PatentIn version 3.1

<210> ¹ 1

⟨211⟩ 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence proteolytic cleavage

<400> 1

Met Thr Ser

⟨211⟩ 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence for proteolytic cleavage

<220>

<221> misc_feature

⟨222⟩ (2)..(2)

<223> The 'Xaa' at location 2 stands for Leu or Gln.

⟨400⟩ 2

Pro Xaa Gly

1

<210> 3

⟨211⟩ 6

<212> PRT

<213> Artificial

<223> artificially
 synthesized sequence for proteolytic cleavage

<220>

<221> misc_feature

⟨222⟩ (2)..(2)

<223> The 'Xaa' at location 2 stands for Leu or Gln.

<400> 3

Pro Xaa Gly Met Thr Ser

1

<210> 4

<211> 5

<212> 'PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence for proteolytic cleavage

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

(223) The 'Xaa' at location 2 stands for Leu or Gln.

Pro Xaa Gly Met Thr

]

5

<210> 5

⟨211⟩ 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

<400> 5

Pro Gln Ser Arg

1

⟨210⟩ 6

⟨211⟩ 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence for proteolytic cleavage

Val Gly Arg

1

⟨210⟩ 7

⟨211⟩ 3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

<400> 7

Gln Ser Arg

1 -

<210> 8

⟨211⟩ 10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

ctttcaccct

10

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

 $\langle 223 \rangle$ artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

<400> 9

tttttcttac tacgg

15

⟨210⟩ 10

⟨211⟩ 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

(223) artificially synthesized sequence containing Not I site

<210> 11

⟨211⟩ 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

<400> 11

gaaacaaaca accaatctag agagcgtatc tgacttgac

39

⟨210⟩ 12

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

⟨211⟩ 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<400> 13

attacggtga ggagggctgt tcgagcagga g

31

<210> '14

⟨211⟩ 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<21	20	15
\ \\ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \ \	·UZ	LU

⟨211⟩ 33

<212> DNA

<213> 'Artificial

<220>

(223) artificially synthesized sequence used in site directed mutagenesis of the Sendai virus

<400> 15

ggggcaatca ccatatccaa gatcccaaag acc

33

<210> 16

⟨211⟩ 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

(210) 17

⟨211⟩ 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

<400> 17

catgctctgt ggtgacaacc cggactaggg gttatca

37

<210> ' 18

⟨211⟩ 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

⟨400⟩ 18

37

⟨211⟩ 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<400> 19

cttgtctaga ccaggaaatg aagagtgcaa ttggtacaat a

41

⟨210⟩ 20

⟨211⟩ 41

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

 $\ensuremath{\texttt{\langle 223\rangle}}$ artificially synthesized sequence for immunization

<400> 21

Met Ala Asp Ile Tyr Arg Phe Pro Lys Phe Ser Tyr Glu Cys

5

<210> '22

⟨211⟩ 13

<212> PRT

<213> Artificial

⟨220⟩

<223> artificially synthesized sequence for immunization

<400> 22

1

Leu Arg Thr Gly Pro Asp Lys Lys Ala Ile Pro His Cys

<210> 23

⟨211⟩ 14

<212> PRT

<213> Artificial

⟨220⟩

<223> artificially synthesized sequence for immunization

<400> 23

Cys Asn Val Val Ala Lys Asn Ile Gly Arg Ile Arg Lys Leu

1

5

10

⟨210⟩ 24

⟨211⟩ 48

<212> DNA

<213> Artificial

⟨220⟩

<223> artificially synthesized sequence used in site directed mutagenesis of the Sendai virus

⟨400⟩ 24

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial.

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<400> 25

tgaggatggt aggatgcctc gtgcacgatc tagttggtca gtgactct

48

<210> ,26

<211> 55

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence for amplifing hygromycin
 resistant gene

<210>	27
-------	----

⟨211⟩ 83

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence for amplifing hygromycin
 resistant gene

<400> 27

aatgcatgat cagtaaatta caatgaacat cgaaccccag agtcccgcct attcctttgc 60 cctcggacga gtgctggggc gtc 83

⟨210⟩ 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

⟨211⟩ 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

<400> 29

ttcccttcat cgactatgac c

21

⟨210⟩ 30

<211> ,22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from Sendai virus

⟨400⟩ 30

agagaacaag actaaggcta cc

⟨211⟩ 6

<212> PRT

<213≻ Artificial

<220>

 $\ensuremath{\texttt{\langle 223\rangle}}$ artificially synthesized sequence for proteolotic cleavage

<400> 31

Pro Leu Gly Leu Gly Leu

1

5

<210> 32

<211> 74

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

<400> 32

ctgtcaccaa tgatacgaca caaaatgccc ctcttggcat gacgagtttc ttcggtgctg 60 tgattggtac tatc 74

⟨211⟩ 74

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

<400> 33

gatagtacca atcacagcac cgaagaaact cgtcatgcca agaggggcat tttgtgtcgt 60 atcattggtg acag 74

<210> '34

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed mutagenesis of the Sendai virus

⟨400⟩ 34

		•
tgattggtac	tatcg	

75

<210> 35

<211> 75

<212≻ DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<400> 35

cgatagtacc aatcacagca ccgaagaata accccaggcc aagaggggca ttttgtgtcg 60 tatcattggt gacag 75

<210> 36

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<400> 36.

caaaatgccg gtgctccccc gttgggattc ttcggtgctg tgatt

45

<210> 37

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

<400> 37

aatcacagca ccgaagaatc ccaacggggg agcaccggca ttttg

45

⟨210⟩ 38

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
 mutagenesis of the Sendai virus

gacacaaaat gccggtgctc ccgtggggag attcttcggt gctgtgattg

50

<210> 39

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence used in site directed
mutagenesis of the Sendai virus

<400> 39

caatcacagc accgaagaat ctccccacgg gagcaccggc attttgtgtc

50

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from F protein of
 Sendai virus

<400> 40.

Gly Val Pro Gln Ser Arg Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from mutagenized F
protein of Sendai virus

<400> 41

Gly Val Pro Leu Gly Met Thr Ser Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

<210> 42

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

 $\langle 223 \rangle$ artificially synthesized sequence derived from mutagenized F

protein of Sendai virus

<400> 42

Gly Val Pro Leu Gly Leu Gly Leu Phe Phe Gly Ala Val

1

F

10

⟨210⟩ 43

⟨211⟩ 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from mutagenized F
 protein of Sendai virus

<400> 43

Gly Val Pro Leu Gly Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

<210> 44

⟨211⟩ 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> artificially synthesized sequence derived from mutagenized F
protein of Sendai virus

<400> 44

Gly Val Pro Val Gly Arg Phe Phe Gly Ala Val

1 5 10

<210> 45

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 'amphiphilic alpha-helix domain of Sendai virus

<400> 45

Lys Ala Cys Thr Asp Leu Arg Ile Thr Val Arg Arg Thr Val Arg Ala

1

5

10

15

<210> 46

⟨211⟩ 8

<212> PRT

<213≻ Artificial

<220>

<223> a synthetic polypeptide

<400> 46

Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr

1

5

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

⟨220⟩

 $\langle 223 \rangle$ a synthetic polypeptide

<400> 47

Glu Ala Arg Glu Ala Lys Arg Asp Ile Ala Leu Ile Lys

1

5

<u>i</u>0

⟨211⟩ 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic polypeptide

<400> 48

Cys Gly Thr Gly Arg Arg Pro Ile Ser Gln Asp Arg Ser

10

<210> 49

⟨211⟩ 31

<212> 'DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer

<400> 49

ccgctcgagc atgacagcat atatccagag a

31

⟨211⟩ 40

<212> DNA

<213> Artificial,

⟨220⟩

<223> a synthetic primer

<400> 50

atagtttagc ggccgctcat ctgatcttcg gctctaatgt

40

⟨210⟩ 51

⟨211⟩ 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer

<400> 51

ccgctcgagc atgacagcat atatccagag a

31

<210> 52

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer

<400> 52

atagtttagc ggccgctcac cttctgagtc tataaagcac

40

⟨210⟩ 53

<211> 31

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial

<220>

<223> 'a synthetic primer

<400> 53

ccgctcgagc atgacagcat atatccagag a

31

<210> 54

<211> 40

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial

<220>

<223> a synthetic primer

<400> 54

atagtttagc ggccgctcac cttctgagtc tataaagcac

40

<210> 55

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

 $\langle 223 \rangle$ a synthetic primer, F-F

<400> '55

atccgaattc agttcaatga cagcatatat ccagag

36

<210> 56

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Fct14-a synthetic primer, Fct14-R

<400>	56

atccgcggcc gccggtcatc tggattaccc attagc

36

<210> 57

<211> 152

<212> DNA

<213> Artificial

⟨220⟩

<223> a synthetic primer, Linker-HN-F

<400> 57

atccgcggcc gcaatcgagg gaaggtggtc tgagttaaaa atcaggagca acgacggagg 60

tgaaggacca gaggacgcca acgacccacg gggaaagggg tgaacacatc catatccagc 120

catctctacc tgtttatgga cagagggtta gg

152

<210> 58

⟨211⟩ 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer, HN-R

<400> 58

atccgcggcc gcttaagact cggccttgca 'taa

33

<210> 59

⟨211⟩ ,32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer

<400> '59

atccgcggcc gcaatggatg gtgatagggg ca

32

<210> 60

⟨211⟩ 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic primer

<400> 60

atccgcggcc gcttaagact cggccttgca

30

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MMP cleavage sequence

<400> 61

Pro Leu Gly Met Thr Ser

<210> 62

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MMP cleavage sequence

<400> 62

Pro Gln Gly Met Thr Ser

1

<210> 63

⟨211⟩ 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> MMP cleavage sequence

<400> '63

Pro Gln Gly Leu Tyr Ala

1.

<210> 64

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial

•	•				•	•	
<220>							٠
<223>	a synthetic ol	ligonucleotid	le used for	mutagenesi	s		
				•			
<400>	64			•			
ctgtcac	ccaa tgatacgac	a caaaatgccc	ctcttggcct	ggggttattc	ttcggtgc	tg	60
tgattg	gtac tatcg						75
<210>	65						
<211>	75						
<212>	DNA	1		•	·,		
<213>	Artificial						
<220>							
⟨223⟩	a synthetic o	ligonucleoti	de used for	mutagenes:	is	• • •	
• • • • • • • • • • • • • • • • • • •						•	
<400>	65		• •				• ,
cgatag	tacc aatcacago	a ccgaagaata	accccaggc	c aagaggggc	a ttttgtg	tcg	60
					•		
tatcat	tggt gacag						75

<210> 66

<211> 74

<212> DNA

(213>	Artificial					•	•
			·.				
(220>			•				
〈223〉	a synthetic	c oligonuc	leotide us	sed for m	utagenesi	s	·
•		,					
<400>	66			5 - 5 ⁵ 1		•	
ctgtca	ccaa tgatac	gaca caaaa	tgccc ctc	agggctt g	gtatgctttc	ttcggtgctg	60
		; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ; ;					
tgattg	gtac tatc	:					74
<210>	67						, .
<211>	74						
<212>	DNA		2 · ·				
⟨213⟩	Artificial		•				•
	•				•		
<220>							
⟨223⟩	a syntheti	ic oligonu	cleotide ı	sed for	mutagenes	is	•
<400>	67						
gatag	tacca atcaca	agcac cgaa	gaaagc ata	acaagccc	tgaggggca	t tttgtgtcg	t 60
	·		* .	<i>:</i>			
atcat	tggtg acag						74

/UII/ 14	<21	1>	•	74
----------	-----	----	---	----

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis

<400> 68

ctgtcaccaa tgatacgaca caaaatgccc ctcaaggcat gacgagtttc ttcggtgctg 60

tgattggtac tatc

74

<210> 69

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

 $\langle 223 \rangle$ a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis

<400> 69

gatagtacca atcacagcac cgaagaaact cgtcatgcct tgaggggcat tttgtgtcgt 60

74

<210> 70

<211>	74	
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
•		ı
<220>		
<223>	a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis	
<400>	70	
ctgtca	ccaa tgatacgaca caaaatgccc ttgcttacta tacggctttc ttcggtgctg	60 .
tgattı	ggtac tatc	74
Ţ ·		÷
<210>	'71	
<211>	74	*.
<212>	DNA	
<213>	Artificial	
<220>		
<223>	a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis	٠
• •		
<400>	71	
gatag	tacca atcacagcac cgaagaaagc cgtatagtaa gcaagggcat tttgtgtcgt	60

atcattggtg acag

74

⟨210⟩ 72

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis

<400> 72

ctgtcaccaa tgatacgaca caaaatgccc ctcttggctt ggcgagattc ttcggtgctg 60

tgattggtac tatc

74

<210> 73

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis

<400> 73

		•
gatagta	acca atcacagcac cgaagaatct cgccaagcca agaggggcat tttgtgtcgt	60
		'
·		
		74
atcatte	ggtg acag	74
		*
<210>	74	•
<211>	50	-
(010)	TOTAL	
<212>	DNA	
(010)	Auticiaia	
(213)	Artificial	١.
		-
⟨220⟩		
⟨223⟩	a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis	
(220)		1
. •		
<400>	74	
cttcgg	gtgct gtgattgcta ctatcgcact tgcagtggcg acatcagcac	50
(010)	77	
<210>	75	•
/011\	50	
⟨211⟩	5 0	
<212>	DNA	
\414 /	מאוע	
/91 9\	Artificial	
/410/	III CIII COLOR	

 $\langle 223 \rangle$ a synthetic oligonucleotide used for mutagenesis

<400> 75

<220>

gtgctgatgt cgccactgca agtgcgatag tagcaatcac agcaccgaag

50

<210> 76

⟨211⟩ 49

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a partial sequence of Sendai virus F protein

<400> 76

Val Ile Val Ile Val Leu Tyr Arg Leu Lys Arg Ser Met Leu Met Gly

1 5 10 15

Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr Leu Glu Pro Lys
20 25 30

Ile Arg His Met Tyr Thr Lys Gly Gly Phe Asp Ala Met Ala Glu Lys
35 40 45

Arg

<210> 77

⟨211⟩ 34

<212> .PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a partial sequence of Sendai virus F protein

<400> 77

Val Ile Val Ile Val Leu Tyr Arg Leu Lys Arg Ser Met Leu Met Gly

1

5

10

15⁻

Asn Pro Asp Asp Arg Ile Pro Arg Asp Thr Tyr Thr Leu Glu Pro Lys

20

25

30

Ile Arg

<210> 78

⟨211⟩ 21

<212> PRT

<213≻ Artificial

<223> a partial sequence of Sendai virus F protein

<400> 78

Val Ile Val Ile Val Leu Tyr Arg Leu Lys Arg Ser Met Leu Met Gly

1 5 10 15

Asn Pro Asp Asp Arg

20

<210> 79

<211> 11

<212> PRT

⟨213⟩ Artificial

<220>

<223> a partial sequence of Sendai virus F protein

<400> 79

Val Ile Val Ile Val Leu Tyr Arg Leu Lys Arg

1 5 10

<211> 50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> a linker sequence

<400> 80

Ala Ala Ile Glu Gly Arg Trp Ser Glu Leu Lys Ile Arg Ser Asn

10 15

Asp Gly Gly Glu Gly Pro Glu Asp Ala Asn Asp Pro Arg Gly Lys Gly

20 25 30

Val Glm His Ile His Ile Glm Pro Ser Leu Pro Val Tyr Gly Glm Arg

35 40 4

Val Arg

50

<210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

⟨400⟩ 81

Ala Gly Val Pro Gln Ser Arg Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

⟨210⟩ 82

⟨211⟩ 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

⟨400⟩ 82

Ala Pro Leu Gly Leu Trp Ala Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

<210> 83

⟨211⟩ 12

<212> PRT.

<213> Artificial

⟨220⟩

<223> F protein cleavage site

⟨400⟩ 83

Ala Pro Leu Gly Met Thr Ser Phe Phe Gly Ala Val

1 5

⟨210⟩ 84

<211> 12

<212> PRT

<213> 'Artificial .

⟨220⟩

<223> F protein cleavage site

<400> 84

1

Ala Pro Leu Gly Leu Gly Leu Phe Phe Gly Ala Val

5 10

⟨210⟩ 85

⟨211⟩ 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

⟨400⟩ 85

Ala Gly Val Pro Pro Leu Gly Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

⟨210⟩ 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

<400> 86

Ala Pro Gln Gly Leu Tyr Ala Phe Phe Gly Ala Val

1

.

10

<210> .87

⟨211⟩ 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

 $\langle 223 \rangle$ F protein cleavage site

<400> 87

Ala Pro Gln Gly Met Thr Ser Phe Phe Gly Ala Val

1

5

10

⟨210⟩ 88

⟨211⟩ 12

<212> PRT

<213≻ Artificial

⟨220⟩

<223> F protein cleavage site

<400> 88

Ala Leu Ala Tyr Tyr Thr Arg Phe Phe Gly Ala Val

1

5

· 10

<210> 89

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

<400> 89

Ala Pro Leu Gly Leu Ala Arg Phe Phe Gly Ala Val

1

F

10

⟨210⟩ 90

⟨211⟩ 23

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

<400> 90

Gln Ser Arg Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Ile Ala Leu Gly Val

1

. 5

10

15

Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr

20

<210> 91

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 'F protein cleavage site

<400> 91

Pro Leu Gly Met Thr Ser Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Ile Ala

1.

C

10

15

Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr

20

25

<210> 92

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

<400> 92

Pro Gln Gly Met Thr Ser Phe Phe Gly Ala Val Ile Gly Thr Ile Ala

1

5

10

15

Leu Gly Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr

20

25

<210> 93

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> F protein cleavage site

<400> 93

Pro Gln Gly Met Thr Ser Phe Phe Gly Ala Val Ile Ala Thr Ile Ala

1

์5

10

15

Leu Ala Val Ala Thr Ser Ala Gln Ile Thr

20

25

⟨210⟩ 94

⟨211⟩ 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized oligonucleotide

<400> 94

atccgctagc ccgtacggcc atggtgagca ag

32

<210> 95

⟨211⟩ 72

<212> DNA

<213> Artificial

⟨223⟩	an artif	icially	synthe	sized o	ligonuc	leotid	e.	•	•	
•				• .	•		· •			
<400>	95			<i>:</i>					•	
atccgcg	gcgc ccgt	acgatg	aacttto	acc cta	agtttt	cttac	tacgg	agcttta	ictt	60
•			·		· · · · · ·					· · · · ·
gtacago	ctcg tc						•			72
					1.					
⟨210⟩	96				, t.					
<211>	31	* '						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
⟨212⟩	DNA			•	!			!		
<213>	Artific	ial	•							
•										· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
⟨220⟩		*		· .			. • •			
⟨223⟩	an arti	ficiall	y synth	esized	oligonu	cleoti	de			
					•	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
<400>	96	~ 0.0.7.5	+0+0+0	ooga a						31

⟨210⟩ 97

⟨211⟩ 66

<212> DNA

⟨213⟩ Artificial

atccacgcgt catgacagca tatatccaga g

•	•	•				•			• .	
<400>	97							•	•	
atccgt	cgac a	cgatgaact	ttcacc	ctaa gtt	tttctta ct	actttaa	c ggtca	tctgg		60
					4	. •				• •
attacc				,		,	•		•	66
	•									
					11					•
. /010\	00									-
<210>										
<211>	•									٠.
<212>	DNA		. •						ī	
<213>	Artii	ficial	· · · ·	•			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·			
								.*		
<220>			· .		,		•			
<223>	an a	rtificial	ly synt	hesized	oligonucle	otide				
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		•	$\gamma_{1}=0$					
<400>	98						**	<i>:</i>	. (
		ccgtacggc	c atggt	tgagca ag			·	-		3
acceg	Ctago	COS GAOSSO	o augg	.64654 46	•					
			,							
		•			•		•		•	
<210>	99			•	•					
<211>	72			.·						•
<212>	DNA					•				
(213)	. Arti	ficial	•						•	

36

 $\langle 223 \rangle$ an artificially synthesized oligonucleotide

<400> 99

atccgctagc ccgtacgatg aactttcacc ctaagttttt cttactacgg agctttactt 6

gtacagctcg tc

<210> 100

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized oligonucleotide

<400> 100

atccgctagc agttcaatga cagcatatat ccagag

⟨210⟩ 101

⟨211⟩ 67

<212> DNA

<213> Artificial

⟨220⟩

67

(223)	an	artificially	synthesized	oligonucleotide
\440/	an	ar crriciarry	DillonoorDea	723

/ 40	^	10	1
<40	(1)	10	1

tgcataa

ataagataga	accatcaact	ttcaccctaa	gtttttctta	ctacttttaa	gactcggcct		60
accogocago	acgargaacr					·	
		+ j	. 1	•			

International application No.

		PC1/UE	703/03326
A. CLASS	IFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.	Cl ⁷ Cl2N15/45, C07K14/115, A61H	K48/00, A61K35/76, A61	K45/00,
	A61P35/00		
According to	o International Patent Classification (IPC) or to both nat	ional classification and IPC	
B. FIELD	S SEARCHED , !		
Minimum d	ocumentation searched (classification system followed b	y classification symbols)	
Int.	C17 C12N15/45, C07K14/115, A611	K48/00, A61K35/76, A61	K45/00,
	A61P35/00		
Documental	ion searched other than minimum documentation to the	extent that such documents are included	in the fields searched
		1	
Electronic d	ata base consulted during the international search (name	of data base and, where practicable, sea	rch terms used)
CAPI	US/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), (Genbank/EMBL/DDBJ/Gene	Seq
,		•	
C. DOCU	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where app	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1106692 A1 (DNAVEC RESEAR	RCH INC.),	1-4,8-14,
	13 June, 2001 (13.06.01),		<u>19-23</u>
Α	Full text	5067500 7	5-7,15-18
	& WO 00/09700 A1 & AU	5067599 A	
<u>Y</u>	Hus, M.C. et al., "Protease a	ctivation mutants of	1-4,8-14,
-	Sendai virus: sequence analys	is of the mRNA of the	<u>19-23</u>
Α	fusion protein(F) gene and di	rect identification	5-7,15-18
	of the cleavage activation si	te", VIROLOGY, (1987),	
	Vol.156, No.1, pages 84 to 90	, particularly,	1
	table 1		
`			
		**	
			<u> </u>
X Furth	ner documents are listed in the continuation of Box C.	See patent family annex.	<u> </u>
* Specia	al categories of cited documents:	"T" later document published after the in priority date and not in conflict with	temational filing date or
consid	nent defining the general state of the art which is not ered to be of particular relevance	understand the principle or theory us	derlying the invention
"E" earlier	document but published on or after the international filing	"X" document of particular relevance; the considered novel or cannot be considered.	e claimed invention cannot be
"L" docum	nent which may throw doubts on priority claim(s) or which is to establish the publication date of another citation or other	step when the document is taken alouer. "Y" document of particular relevance; the	ne e claimed invention cannot be
specia	l reason (as specified) nent referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	considered to involve an inventive si combined with one or more other su	ep when the document is ch documents, such
means	; nent published prior to the international filing date but later	combination being obvious to a pers "&" document member of the same pater	
	he priority date claimed actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	arch report
	July, 2003 (31.07.03)	12 August, 2003 (1	2.08.03)
No-no -=-1	mailing address of the ISA/	Authorized officer	
	anese Patent Office	Tremotitod officei	
Facsimile l	No.	Telephone No.	

International application No. PCT/JP03/05528

C (Continua	tion). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages		Relevant to claim No.
<u>Y</u> A	Caravokyri, C. et al., "Defective synthes envelope proteins by temperature-sensitive representing complementation groups B and respiratory syncytial virus", JOURNAL OF VIROLOGY, (1991), Vol.72, Pt.10, pages 25 2508, Figs. 5, 6; Discussion	1-4,8-14, <u>19-23</u> 5-7,15-18	
Y A	YOSHIDA, T. et al., "Studies on the role protein in virus assembly using a ts muta HVJ (Sendai virus)", VIROLOGY, (1979), Vo No.1, pages 139 to 154, particularly, Fig 5 to 10; abstract	nt of 1.92,	1-4,8-14, <u>19-23</u> 5-7,15-18
Y A	Stone-Hulslander, J. et al., "Detection o interaction between the HN and F proteins Newcastle disease virus-infected cells", OF VIROLOGY, (1997), Vol.71, No.9, pages 6295, abstract	in JOUR NA L	1-4,8-14, <u>19-23</u> 5-7,15-18
<u>Y</u> A	TAIRA, H. et al., "Transfection of Sendai F gene cDNA with mutations at its cleavag and HN gene cDNA into COS cells induces of fusion", ARCHIVES OF VIROLOGY, (1995), Vo No.1, pages 187 to 194, abstract	ge site cell	1-4,8-14, <u>19-23</u> 5-7,15-18
<u>Y</u> A	Yao, Q. et al., "Differences in the role cytoplasmic domain of human parainfluenza fusion proteins", JOURNAL OF VIROLOGY, (1 Vol.69, No.11, pages 7045 to 7053, abstra	virus 1995),	1-4,8-14, <u>19-23</u> 5-7,15-18
A	Li, Z. et al., "Effect of cleavage mutant syncytium formation directed by the wild- fusion protein of Newcastle disease virus JOURNAL OF VIROLOGY, (1998), Vol.72, No.5 pages 3789 to 3795, abstract	-type s",	1-23
A	TANABAYASHI, K. et al., "Effect on fusion of point mutations introduced into the F of mumps virus", VIROLOGY, (1994), Vol.20 pages 851 to 853	protein	1-23

International application No.

PCT/JP03/05528 ·

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)			
This inte	mational search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	Claims Nos.:		
	because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:		
`.			
2.	Claims Nos.:		
	because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:		
	extent that no meaning an international souten can be carried out; spoothearly.		
• ;			
3.	Claims Nos.:		
	because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).		
Box II	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
	ernational Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
11112 11116	(See extra sheet.)		
ľ			
Ĭ			
1			
1			
] · .			
ł			
1.	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable		
l L	claims.		
1			
	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment		
ا ا			
l ·	of any additional fee.		
 	As and a same of the required additional mouth fore more timely and by the applicant, this international count		
3. 🗀	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers		
	only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:		
1			
Į			
4.	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is		
╻┈└┤	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
i	restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:		
Remarl	k on Protest		
1	No protest accompanied the payment of additional search fees.		
I			

International application No.

PCT/JP03/05528

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Claims 1 to 18 relate to genomic RNA being a paramyxovirus genomic RNA and characterized by encoding a protein which is a modified F protein having a mutation of a nucleic acid encoding an M protein or lacking the same and in which the sequence at the cleavage site has been modified into another sequence cleaved with a protease not cleaving a wild type

On the other hand, claims 19 to 23 relate to a fused protein of a paramyxovirus F protein with an HN protein and the characteristic feature thereof preferably resides in that the above F protein is cleaved by a protease which does not cleave a wild type F protein.

However, there had been publicly known an F protein in which the sequence at the cleavage site has been modified into a sequence cleaved by a protease not cleaving a wild type F protein, as reported by, for example, Hsu, M.C. et al., "Protease activation mutants of Sendai Virus: sequence analysis of the mRNA of the fusion protein (F) gene and direct identification of the cleavage-activation site", VIROLOGY, (1987), Vol.156, No.1, pp.84-90. Thus, it cannot be considered as a special technical feature common to the above 2 groups of inventions.

Since the latter group of inventions is free from the technical feature of being a paramyxovirus genomic RNA having a mutation in a nucleic acid encoding an M protein or lacking the same, the above groups of inventions are different from each other in technical feature.

As discussed above, it is recognized that the present application has 2 groups of inventions having different technical features.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int. Cl' C12N15/45, C07K14/115, A61K48/00, A61K35/76, A61K45/00, A61P35/00

3. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/45, C07K14/115, A61K48/00, A61K35/76, A61K45/00, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

	と認められる文献	関連する
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	EP 1106692 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 2001.06.13, 全文参照,	1-4, 8-14,
<u>.</u>	& WO 00/09700 A1 & AU 5067599 A	19-23
Ā		5-7, 15-18
. [
	Hsu, M.C. et al, "Protease activation mutants of Sendai	1-4, 8-14,
_	virus: sequence analysis of the mRNA of the fusion protein	19-23
A	(F) gene and direct identification of the cleavage-	5-7, 15-18
	activation site" VIROLOGY, (1987), Vol. 156, No. 1, pp. 84-90,	
1	特に Table 1 参照	

⋉ C欄の続きにも文献が列挙されている。

□ パテントファミリーに関する別紙を参照。

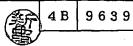
- * 引用文献のカテゴリー
- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す もの
- [E] 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日 以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行 日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する 文献(理由を付す)
- 「O」ロ頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって 出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論 の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明 の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以 上の文献との、当業者にとって自明である組合せに よって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 31.07.03 国際調査報告の発送日 2.08.03

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP)

郵便番号100-8915 東京都千代田区館が関三丁目4番3号 特許庁審査官(権限のある職員) 新留 豊



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) .	関連すると認められる文献	•
引用文献の		関連する
カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	Caravokyri, C. et al, "Defective synthesis of envelope	1-4, 8-14,
Ā	proteins by temperature-sensitive mutants representing	<u>19-23</u>
n	complementation groups B and D of respiratory syncytial virus" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, (1991), Vol. 72, Pt. 10,	5-7, 15-18
	pp. 2501-2508, Fig. 5,6 及び Discussion 参照	•
Y	Yoshida, T. et al, "Studies on the role of M protein in	1-4, 8-14,
<u> -</u>	virus assembly using a ts mutant of HVJ (Sendai virus)"	19-23
A	VIROLOGY, (1979), Vol. 92, No. 1, pp. 139-154, 特にFig. 5-10 及	5-7, 15-18
	び要約参照	
Y	Stone-Hulslander, J. et al, "Detection of an interaction	1-4, 8-14,
	between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-	19-23
Ā	infected cells" JOURNAL OF VIROLOGY, (1997), Vol. 71, No. 9,	5-7, 15-18
	pp. 6287-6295,要約参照	
Y	Taira, H. et al, "Transfection of Sendai virus F gene cDNA	1_4 0.14
	with mutations at its cleavage site and HN gene cDNA into	1-4, 8-14, 19-23
Ā	COS cells induces cell fusion" ARCHIVES OF VIROLOGY, (1995),	19 23 5-7, 15-18
	Vol. 140, No. 1, pp. 187-194, 要約参照	0 ., 10 10
Y	Yao, Q. et al, "Differences in the role of the cytoplasmic	1-4, 8-14,
\overline{A}	domain of human parainfluenza virus fusion proteins" JOURNAL OF VIROLOGY, (1995), Vol. 69, No. 11, pp. 7045-7053,	19-23 5-7 15-19
A	要約参照	5-7, 15-18
A	Li, Z. et al, "Effect of cleavage mutants on syncytium	1-23
	formation directed by the wild-type fusion protein of	
	Newcastle disease virus JOURNAL OF VIROLOGY, (1998),	
	Vol. 72, No. 5, pp. 3789-3795, 要約参照	
A	Tanabayashi, K. et al, "Effect on fusion induction of point	1-23
	mutations introduced into the F protein of mumps virus"	
	VIROLOGY, (1994), Vol. 204, No. 2, pp. 851-853	
•		

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)	- //-
法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について成しなかった。	.17=
1. 請求の範囲 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。	•
つまり、	.
	.
	. [
	-
2. □ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たして ない国際出願の部分に係るものである。つまり、	<u>بر</u>
	١
	,_
3. [請求の範囲	ا کا
第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見(第1ページの3の続き)	7. 1
 次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。	
Mary 200 Mary 100 Mar	
	٠.
別紙参照	
	, .
│ │ 1. │ │ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な誤	去七
1. 山殿大が必要な追加制造子敷料をすべて雰囲げれたが打したので、この国族制造報告は、すべての制造可能な影響の範囲について作成した。	17
2. ② 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、 加調査手数料の納付を求めなかった。	追
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の	の納
付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。 	
	•
4.	記載
追加調査手数料の異比の申立てに関する注意 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	
追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。	,

(第 I I 欄の別紙)

請求の範囲1-18は、パラミクソウイルスゲノムRNAであって、Mタンパク質をコードする核酸が変異又は欠失しており、かつ改変Fタンパク質であって、該タンパク質の開裂部位の配列が、野生型Fタンパク質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換されたタンパク質をコードすることを特徴とするゲノムRNAに関するものである。

一方、請求の範囲19-23はパラミクソウイルスFタンパク質及びHNタンパク質の融合タンパク質に関するものであり、好ましくは、上記Fタンパク質は野生型Fタンパク質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換されたタンパク質を用いることを特徴とする。

しかしながら、開裂部位の配列が野生型Fタンパク質を開裂しないプロテアーゼによって開裂される配列に置換されたFタンパク質は、例えばHsu, M.C. et al, "Protease activati on mutants of Sendai virus: sequence analysis of the mRNA of the fusion protein (F) gene and direct identification of the cleavage-activation site," VIROLOGY, (1987), Vol. 156, No. 1, pp. 84-90 にも記載のとおり公知であるので、これを上記2つの発明に共通する特別な技術的特徴とすることはできない。

後者の発明はMタンパク質をコードする核酸が変異又は欠失しているパラミクソウイルス ゲノムRNAという技術的特徴を有せず、したがって、上記両者は異なる技術的特徴を有す る発明である。

以上より、この出願には技術的特徴が異なる2つの発明があると認められる。

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS	
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES	
FADED TEXT OR DRAWING	
BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING	
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES	
COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS	
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS	
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT	
REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY	

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

☐ OTHER: ___

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.